Sammlung chemischer
und chemisch-technischer Vorträge
Begründet von F. B. Ahrens
Herausgegeben von Professor Dr. R. Pummerer-Erlangen
Neue Folge Heft 29.

Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Naturstoffe

Herzgifte, Hormone, Saponine und Vitamin D

Dr. H. Lettré
Assistent am Allgemeinen Chemischen
Universitäts-Laboratorium Göttingen

und

Dr. H. H. Inhoffen
z. Zt. London, The Middlesex Hospital
The Courtauld Jnst. of Biochem.

mit einem Geleitwort von

Prof. Dr. A. Windaus
Direktor des Allgemeinen Chemischen
Universitäts-Laboratoriums Göttingen

Mit 2 Tafeln

1 · 9 · 3 · 6
VERLAG VON FERDINAND ENKE IN STUTTGART

A. Oelschläger'sche Buchdruckerei, Calw

Vorwort

Teile des diesem Buch zu Grunde liegenden Themas sind schon in einer Reihe von kürzeren Zusammenfassungen behandelt worden. Es war unser Wunsch, mit diesem Buch eine Darstellung des gesamten Gebietes zu geben, und zwar nicht nur dem allgemein Interessierten einen Überblick zu verschaffen, sondern auch dem, der unmittelbar an dem Gebiet beteiligt ist, durch Angabe von experimentellem Material und physikalischen Konstanten eine Hilfe an die Hand zu geben. Der Rahmen des Buches verbot eine handbuchhafte Vollständigkeit, doch hoffen wir wenigstens das Wichtigste gebracht zu haben und danken dem Verlag für sein Entgegenkommen in dieser Richtung. Die Literatur ist bis zum September vorigen Jahres (soweit angängig auch die neueren Datums) berücksichtigt. Herrn Professor Windaus sind wir für sein förderndes Interesse zu großem Dank verpflichtet.

Göttingen und London, Anfang 1936.

Die Verfasser.

Geleitwort

Zu der Beschäftigung mit den Sterinen bin ich im Jahre 1901 von Heinrich Kiliani angeregt worden. Wenn mein Lehrer, der in diesen Tagen (am 30. Oktober 1935) seinen 80. Geburtstag feiert, auf die Entwicklung der in Freiburg begonnenen Arbeiten zurückblickt, wird er mit Genugtuung feststellen, welchen Umfang und welche Bedeutung die Chemie und Biologie der Sterinabkömmlinge inzwischen gewonnen hat und wie seine Vermutungen über die Verwandtschaft der Sterine mit den Digitalisstoffen sich bestätigt haben.

Den Anfang der langwierigen Untersuchungen über Cholesterin habe ich fast allein durchgeführt; aber allmählich hat sich eine steigende Zahl von Chemikern und Biologen der Erforschung des Gebietes zugewandt und hat es in den letzten Jahren in glänzender Weise erweitert und gefördert. Für mich ist es eine besondere Freude, daß der Nachwuchs, der aus dem Göttinger Arbeitskreis hervorgegangen ist, sich in erfolgreicher Weise an der Lösung der Probleme beteiligt hat, und daß durch die Zusammenarbeit verschiedener Forschungsstätten nunmehr in den Hauptfragen ein vorläufiger Abschluß erreicht worden ist.

Zu diesem Zeitpunkt erscheint eine Zusammenfassung des bisher Erreichten besonders erwünscht. Die Durchführung dieser Aufgabe haben in dem vorliegenden Buch Herr Dr. Lettré und Herr Dr. Inhoffen unternommen, die selbst jahrelang auf dem Gebiete der Sterine gearbeitet haben. Ich hoffe, daß ihr Buch den Beifall der Fachgenossen findet und Anregungen für neue Untersuchungen liefert.

Göttingen, im Oktober 1935.

A. Windaus.

Inhaltsverzeichnis

A. Über Sterine und Gallensäuren

A I. Einleitung

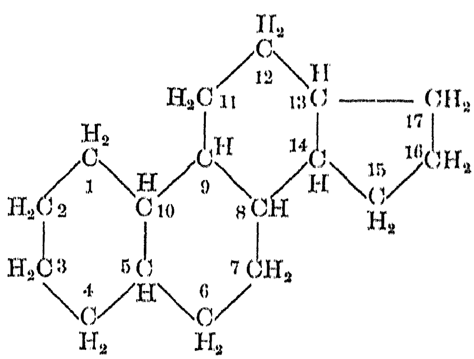
Im Jahre 1911 hat Windaus die Gruppe der Sterine durch die folgenden gemeinsamen Reaktionen charakterisiert:

„Die Sterine sind hochmolekulare, ungesättigte wasserstoffreiche Alkohole, die in bezug auf das Verhältnis von Kohlenstoff- zu Wasserstoffatomen den Polyterpenen nahestehen. Sie kristallisieren aus Äther wasserfrei in Nadeln, aus verdünntem Alkohol in Blättchen, die ein Mol Kristallwasser enthalten. Mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure, sowie mit einigen anderen Reagentien geben sie ziemlich charakteristische Farbenreaktionen. Sie wirken entgiftend auf Saponine und geben, soweit die bisherigen Untersuchungen reichen, mit Digitonin unlösliche Additionsprodukte" (Bioch. Handlexikon, Bd. III, 268).

Die Sterine finden sich in jeder tierischen und pflanzlichen Zelle, sie sind primäre Zellbestandteile. Noch nicht völlig gesichert ist ihr Vorkommen in Bakterien. Nach ihrer Herkunft teilt man die Sterine in tierische oder Zoo-sterine, pflanzliche oder Phytosterine und in Pilz- oder Mycosterine ein. Das verbreitetste und wichtigste tierische Sterin ist das Cholesterin von der Zusammensetzung $C_{27}H_{46}O$. Von ihm leiten sich zwei andere Zoo-sterine, das Dihydrocholesterin und das Koprosterin ab. Von den pflanzlichen Sterinen ist das Stigmasterin aus der Calabar-Bohne am besten untersucht. Weniger umfassend sind unsere Kenntnisse von dem verbreitetsten Phytosterin, dem Sitosterin. Der Grund liegt darin, daß sich gerade bei diesem Stoff die Eigenschaft der Sterine, mit ähnlichen Stoffen schwer trennbare Mischkristalle zu bilden, besonders störend bemerkbar macht. Mit der Bezeichnung Sitosterin umfaßt man eine Reihe von außerordentlich ähnlichen Sterinen, die sich nicht oder nur sehr schwierig voneinander trennen lassen, so daß hier die notwendigste Bedingung für eine chemische Bearbeitung, ein einheitliches Ausgangsmaterial, fehlt. Von den Pilzsterinen hat das Ergosterin große Bedeutung erlangt, da es sich durch die Einwirkung des ultravioletten Lichts in einen antirachi-

tisch wirksamen Stoff verwandeln läßt. Hier seien zunächst nur diese wichtigsten Sterine aufgeführt, die übrigen werden weiter unten noch Erwähnung finden.

Nachdem heute der Aufbau der wichtigsten Sterine geklärt ist, kann man aus ihrer Konstitution heraus schärfere Kennzeichen dieser Stoffklasse angeben. Die Sterine sind Derivate des Cyclopentano-perhydro-phenanthrens. Sie besitzen in den bisher untersuchten Fällen eine Hydroxylgruppe am C-Atom 3 und tragen je eine Methylgruppe an den C-Atomen 10 und 13. Sie unterscheiden sich voneinander durch ihren Sättigungsgrad und durch den Aufbau einer aliphatischen Seitenkette, die sie am C-Atom 17 tragen.



Cyclo-pentano-perhydro-phenanthren

(Die Bezifferung der C-Atome ist in der bei den Sterinen und Gallensäuren eingeführten Weise angegeben.)

In der Literatur findet man eine Reihe von Stoffen beschrieben, die auf Grund der zuerst angegebenen allgemeineren Reaktionen als Sterine bezeichnet wurden. Im Interesse einer eindeutigen Klassifizierung scheint es jedoch erwünscht, nur den Stoffen den Namen eines Sterins zu geben, in denen tatsächlich das Cyclo-pentano-perhydro-phenanthren-skelett nachgewiesen ist. Vor allem ist die Abgrenzung gegenüber den nahe verwandten Polyterpenen geboten.

Als Beispiel sei der Fall des sog. Isocholesterins erwähnt, das zunächst als ein Isomeres des Cholesterins angesehen wurde. Eine eingehendere Untersuchung brachte den Nachweis, daß es sich im „Isocholesterin" um ein Gemisch zweier Substanzen handelt, deren Zusammensetzung von der des Cholesterins verschieden ist[1]). Diese Stoffe wurden auch als Sterine bezeichnet, sie erhielten die Namen Lanosterin

[1]) Windaus und Tschesche, H. 190, 151 (1930).

und Agnosterin. Die neuesten Untersuchungen[2]) ergaben, daß beide Stoffe nicht mit den typischen Sterinen verwandt sind, sie müssen in die Gruppe der Polyterpene oder Polyterpenoide eingereiht werden.

Die Gallensäuren liegen in der Gallenflüssigkeit gepaart mit Taurin oder Glykokoll als Natriumsalze vor. Sie haben in dieser Form die Funktion, Stoffe, die an sich in Wasser unlöslich sind, etwa Fette, zu emulgieren, in eine wasserlösliche Form zu bringen und so deren Resorption zu erleichtern. Die „spezifischen“ Gallensäuren, die man durch Hydrolyse aus ihrer Vereinigung mit Taurin oder Glykokoll freimacht, sind Oxy-carbonsäuren, und zwar sind sie ebenso wie die Sterine Derivate des Cyclo-pentano-perhydro-phenanthrens. Die wichtigste spezifische Gallensäure ist die Cholsäure, eine Trioxy-carbonsäure $C_{24}H_{40}O_5$, die in den Gallen sehr vieler Wirbeltiere aufgefunden wurde. Neben dieser sind noch eine große Anzahl meist sauerstoffärmerer Gallensäuren isoliert worden. So findet sich in der Rinder- und Menschengalle die Desoxycholsäure, in der Schweinegalle die Hyodesoxycholsäure, und in der Hühner- und Gänsegalle die Chenodesoxycholsäure. Diese drei Gallensäuren sind Dioxy-carbonsäuren von der Zusammensetzung $C_{24}H_{40}O_4$. Von den übrigen bekannten Gallensäuren sei hier zunächst nur noch die Lithocholsäure $C_{24}H_{40}O_3$ erwähnt.

An Hand der hier genannten Gallensäuren und des Cholesterins soll zunächst ein Weg gezeigt werden, der einen Einblick in den Aufbau dieser Stoffe gestattet, ihre Beziehungen zum Cyclo-pentano-perhydro-phenanthren aufzeigt und zugleich die Methoden entwickelt, die später zur Konstitutionsaufklärung anderer Sterine und Gallensäuren und der verwandten Stoffe Anwendung finden. Bei der Konstitutionsaufklärung greifen die Versuche am Cholesterin, am Koprosterin und an den Gallensäuren eng ineinander. So kommt es, daß zunächst die Konstitution des Cholesterins bis zu einem gewissen Punkt abgeleitet wird, daran schließt sich die Besprechung des Koprosterins an, von ihm aus wird zu den Gallensäuren übergegangen. Erst die Zusammenfassung dieser Versuche gibt das abgeschlossene Bild vom Aufbau des Cholesterins.

Der Weg, auf dem hier die Konstitution des Cholesterins und der Gallensäuren abgeleitet wird, ist ein systematischer und nicht der historische Weg. Die Untersuchungen an diesen Stoffen, die auf dem Gebiet des Cholesterins vor allem mit den Namen Windaus, Diels,

[2]) Windaus und Schulze, s. H. 238, 35 (1936).

Mauthner und Rosenheim, auf dem der Gallensäuren mit denen von Wieland, Windaus, Schenck und Borsche verknüpft sind, haben ein außerordentlich umfangreiches experimentelles Material entstehen lassen, aus dem sich sicher noch andere Möglichkeiten der Darstellung der Konstitutionsaufklärung herausarbeiten ließen. Es scheint jedoch heute, nachdem die Arbeiten zu einem Abschluß gekommen sind, gerechtfertigt, den übersichtlichsten Weg einzuschlagen, um so auch dem, der diesem Gebiet ferner steht, die Möglichkeit zu geben, sich in den Aufbau dieser Stoffe einzudenken. Gerade auf diesem Gebiet ist das Verständnis der Originalliteratur durch die mannigfachen Umänderungen, die die Anschauungen über den Aufbau dieser Stoffe erfahren haben, außerordentlich erschwert.

A II. Die Konstitutionsaufklärung des Cholesterins und der Gallensäuren

A II a. Cholesterin; Isolierung, Eigenschaften und Summenformel

Gegen Ende des 18. Jahrhunderts wurde in menschlichen Gallensteinen eine schön kristallisierte Substanz aufgefunden, die in ihren Löslichkeitsverhältnissen den Fetten ähnelt. Chevreul, der sie zuerst genauer untersuchte, nannte den Stoff daher Gallenfett (Cholestearin, Cholesterin)[1]). Die weitere Untersuchung zeigte, daß diese Substanz im menschlichen und tierischen Organismus sehr verbreitet ist. Aus allen Organen, die untersucht wurden, ließ sie sich gewinnen. Als Beispiel der Darstellung des Cholesterins sei hier die bequemste Methode, die Gewinnung aus Gallensteinen, angeführt.

Gallensteine werden solange im Extraktionsapparat mit Äther extrahiert, bis sie in ihrer ursprünglichen Struktur völlig zerfallen sind. Der Äther wird abgedampft und der Rückstand mit Alkohol aufgenommen. Man kocht dann die Lösung nach Zusatz von alkoholischer Kalilauge einige Stunden unter Rückfluß, um anhaftendes Fett zu verseifen. Beim Erkalten scheidet sich das Cholesterin in schönen Blättchen aus. Es wird abfiltriert und mit Alkohol ausgewaschen und zur Reinigung aus Äther-Alkohol oder Alkohol umkristallisiert. Ein auf diese Weise dargestelltes Cholesterin enthält noch geringe Mengen von gesättigten und ungesättigteren Begleitstoffen, die sich durch Umkristallisation nicht abtrennen lassen. Um ein reines Cholesterin darzustellen, führt man es nach einer unten angegebenen Vorschrift durch Behandlung mit Brom in das schwerlösliche Dibromid über. Die gesättigten Stoffe liefern kein Bromid, die ungesättigten werden von Brom weitgehend verändert und beide bleiben in der Mutterlauge. Aus dem Cholesterin-Dibromid läßt sich durch Reduktionsmittel das Brom wieder ent-

[1]) s. Gmelin, Handbuch der Chemie.

fernen[2]). Schönheimer[3]) empfiehlt zur Verwandlung des Dibromids in Cholesterin die Anwendung von Natriumjodid.

Cholesterin bildet weiße, glänzende Kristalle, die sich fettig anfühlen. Aus wasserfreien Lösungsmitteln (Äther, Essigester usw.) kristallisiert es in Nadeln, die kein Kristallösungsmittel enthalten. Aus wasserhaltigem Alkohol erscheint es in charakteristischen rhombischen Tafeln, die ein Mol Kristallwasser enthalten. Das getrocknete Cholesterin zeigt den Schmp. 148,5° (korr.). Es ist optisch aktiv, es dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach links. In ätherischer Lösung ist $[\alpha]_D = -31{,}12°$. $d_{18} = 1{,}052$—1,053[4]). Cholesterin ist in Wasser, Alkalien und Säuren unlöslich. Es ist leicht löslich in Schwefelkohlenstoff, Pyridin, Chloroform (1 : 6,6), Benzol und Äther (1 : 3,9). Schwerer löslich ist es in Petroläther, Aceton und kaltem Alkohol. In kochendem absolutem Alkohol löst es sich im Verhältnis 1 : 9. In kaltem Eisessig ist es wenig löslich, aus einer heißen Eisessiglösung kristallisiert es mit einem Molekül Kristalleisessig. Durch Eingießen einer Lösung von Cholesterin in Aceton in Wasser kann man eine relativ beständige kolloidale wäßrige Lösung gewinnen[5]). In einem gewissen Grade löst es sich auch in den Alkalisalzen der Fettsäuren, der Gallensäuren sowie derjenigen Säuren, die man bei der Einwirkung von Oxydationsmitteln auf Cholesterin erhält[6]).

Nachweis des Cholesterins. Wenn nicht zu geringe Mengen Material vorliegen, ist meist die Reindarstellung des Cholesterins möglich, das dann durch seine physikalischen Konstanten charakterisiert werden kann. Es kann durch folgende Fällungsreaktionen nachgewiesen werden:

1. Cholesterin wird in möglichst wenig Äther gelöst und mit einer Brom-Eisessig-Mischung (5 g Brom in 100 g Eisessig) bis zur bleibenden Braunfärbung versetzt. Cholesterindibromid scheidet sich in langen Nadeln vom Schmp. 122—25° aus[7]).

2. Cholesterin in Pyridin gelöst gibt mit Lithiumchlorid in Pyridin eine

[2]) Wislicenus und Moldenhauer, A. 146, 175 (1868). Windaus und Lüders, H. 109, 183 (1920).

[3]) Schönheimer, H. 192, 87 (1930).

[4]) Reinitzer, Mh. f. Ch. 9, 422 (1889). Hesse, A. 192, 178 (1870). Diels und Linn, B. 41, 260 (1908). Zeynek, H. 209, 97 (1932). Refraktometrische Messungen an Cholesterin und Derivaten s. Tschugaeff und Koch, A. 385, 352 (1911), v. Auwers und Wolter, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, 1931, III, 101.

[5]) Porges und Neubauer, Bio. Z. 7, 152 (1908).

[6]) Gérard, Malys Jahresber. 35, 516.

[7]) Windaus, Chemiker-Zeitg. 30, 1011 (1906). B. 39, 518 (1906). H. 115, 258 (1921).

kristallisierte schwerlösliche Anlagerungsverbindung vom Schmp. 140°. Mit Hilfe dieser Reaktion kann Cholesterin von Fett getrennt werden[8]).

3. Eine heiße alkoholische Lösung von Cholesterin wird mit einer heißen 1proz. Lösung von Digitonin in 90proz. Alkohol versetzt. Bald kristallisiert Cholesterin-Digitonid $C_{83}H_{138}O_{30}$ in Form von Nadeln aus. Es wird filtriert und mit Äther und Alkohol ausgewaschen. Zersetzungspunkt bei ca. 240°. Die Additionsverbindung ist unlöslich in kaltem Wasser, Aceton und Äther, sehr wenig löslich in kaltem 96proz. Alkohol, leichter löslich ist sie in kochendem Wasser, heißem absoluten Alkohol, in Methylalkohol, Eisessig und Pyridin[9]).

Zur Zerlegung der Cholesterin-Digitonin-Verbindung kann man drei Methoden anwenden: Einmal kann man in der Digitonin-Cholesterin-Anlagerungsverbindung durch Kochen mit Essigsäureanhydrid das Cholesterin acetylieren und nunmehr glatt als Cholesterylacetat durch Äther herausziehen.

Zweitens: Bei höherer Temperatur kann man die Zerlegung der Verbindung durch Lösungsmittel bewirken, die nur Cholesterin, aber nicht Digitonin auflösen. Am besten eignet sich hierzu siedendes Xylol. Das Digitonid wird in einem Extraktionsapparat mit siedendem Xylol extrahiert, bis der Rückstand die Liebermann-Burchard'sche Reaktion nicht mehr zeigt. Das Cholesterin geht in das Xylol über und läßt sich durch Abdestillieren des Xylols mit Wasserdampf leicht gewinnen. Das Digitonin bleibt in der Extraktionshülse.

Die schnellste Methode zur Zerlegung des Digitonids ist in letzter Zeit von Schönheimer und Dam ausgearbeitet worden. Das Digitonid wird in Pyridin gelöst, in dem es offenbar weitgehend in seine Komponenten zerfallen ist. Durch Zusatz von Äther wird das Digitonin ausgefällt, das Sterin bleibt in Lösung und kann nach Abdampfen des Pyridins im Vakuum oder durch Ausfällen mit Wasser isoliert werden[10]).

Sehr beliebt sind zum Nachweis des Cholesterins eine Anzahl von Farbreaktionen, die z. T. sehr empfindlich sind. Doch müssen gegen die ausschließliche Verwendung dieser Nachweismethoden Bedenken geltend gemacht werden[11]).

Erstens: Die Farbenreaktionen sind meistens nicht für das Cholesterin charakteristisch. Sie werden nicht nur von den Phytosterinen und Derivaten des Cholesterins, sondern auch von vielen anderen hochmolekularen ungesättigten Alkoholen, von manchen Harzsäuren sowie von einigen Terpenen geliefert[12]).

Zweitens: Die Farbenreaktionen werden meist durch Zusatz konzentrierter Schwefelsäure hervorgerufen. Sind nun in dem zu untersuchenden Material Bestandteile vorhanden, die sich mit konzentrierter Schwefelsäure braun oder schwarz färben, so wird die Farbenreaktion des Cholesterins

[8]) Zwikke, ref., Chem. Centralbl. 1917, I. 1077.

[9]) Windaus, B. 42, 238 (1909). H. 65, 110 (1910). Thayson, Bio. Z. 62, 99 (1914). Fex, Bio. Z. 104, 82 (1920). Dam, Bio. Z. 194, 177 (1928).

[10]) Schönheimer und Dam, H. 215, 59 (1933).

[11]) Windaus, Arch. d. Pharmacie 246, 123 (1908).

[12]) Zum Beispiel Ruzicka c. s., Helv. Ch. A. 18, 67 (1935).

hierdurch gestört oder ganz verdeckt. Die bekanntesten Farbreaktionen seien kurz angeführt:

a) Wird zu kristallisiertem Cholesterin auf dem Objektträger etwas 80proz. Schwefelsäure gegeben, so färben sich die Kristalle zuerst carminrot, dann violett. Wird ein wenig Jodtinktur zugesetzt, so zeigen die Kristalle nacheinander Färbungen in violett, blau, grün und rot. Dieses Verhalten bietet ein gutes mikroskopisches Erkennungsmittel für Cholesterin[13]).

b) Salkowski'sche Reaktion: Man löst Cholesterin in Chloroform und fügt das gleiche Volumen konzentrierte Schwefelsäure hinzu. Die Chloroformlösung färbt sich blutrot und wird allmählich purpurrot, während die Schwefelsäure grün fluoresziert[14]).

c) Liebermann-Burchards Reaktion: Versetzt man eine Lösung von Cholesterin in Chloroform unter Kühlung tropfenweise mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure, so wird die Lösung erst rosenrot, dann violett, blau und schließlich dunkelgrün[15]).

d) Obermüllers Reaktion: Trockenes Cholesterin wird mit einigen Tropfen Propionsäureanhydrid über kleiner Flamme geschmolzen. Beim Abkühlen sieht man violette, dann blaugrüne, orange, kupferrote Farbtöne, besonders beim Betrachten gegen einen dunklen Hintergrund[16]).

e) Wird Cholesterin in Eisessig gelöst, mit Acetylchlorid und etwas Chlorzink versetzt und einige Minuten gekocht, so tritt eine eosinrote Farbe auf. Nach Tschugaeff tritt die Reaktion noch in einer Verdünnung 1 : 80 000 auf[17]).

Zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins eignet sich am besten die gravimetrische Digitoninmethode. Aus dem Gewicht des nach der obigen Vorschrift gewonnenen Digitonids berechnet sich das vorhandene Cholesterin durch Multiplikation mit dem Faktor 0,25 (genau 0,239) (s. S. 16).

Die Formel des Cholesterins ist $C_{27}H_{46}O$. Die sichere Festlegung der Formel des Cholesterins hat große Schwierigkeiten bereitet, die einmal in der relativ schweren Verbrennbarkeit des Cholesterins und seiner Derivate begründet sind. Zum anderen beruhen sie darauf, daß die Differenzen in den C- und H-Werten etwa einer Formel $C_{26}H_{44}O$ und $C_{27}H_{46}O$ so gering sind, daß man sie durch die Elementaranalyse nicht eindeutig unterscheiden kann. Es berechnen sich für die Formeln:

$C_{26}H_{44}O$	$C_{27}H_{46}O$	$C_{28}H_{48}O$	
83,80	83,86	83,92	Prozent Kohlenstoff
11,91	11,99	12,08	Prozent Wasserstoff

[13]) Hoppe-Seyler-Thierfelder, IX. Aufl., 326.
[14]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 6, 207 (1872).
[15]) B. 18, 1804 (1885). Burchard, Dissert. Rostock 1889.
[16]) H. 15, 38 (1891).
[17]) Ref. Z. f. angew. Ch. 1900, 618.

Berthelot[18]) stellte im Jahre 1856 die Formel $C_{26}H_{44}O$ für das Cholesterin auf. Aus den angegebenen Zahlenwerten erkennt man aber leicht, daß durch die Elementaranalyse des Cholesterins selbst eine solche Formel nicht sicher bewiesen werden kann. Größere Differenzen in der Zusammensetzung ergeben sich erst, wenn man Derivate untersucht, die einen möglichst großen Prozentgehalt an Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel oder Halogen enthalten. Reinitzer[19]) hat die richtige Formel des Cholesterins dadurch ermittelt, daß er das Cholesterylacetat-dibromid sorgfältig analysierte. Bei diesem Stoff sind die Differenzen in den Kohlenstoff- und Wasserstoffwerten für Formeln mit 26, 27 oder 28 C-Atomen so groß, daß sie außerhalb der Fehlergrenze der Elementaranalyse liegen:

$C_{26}H_{43}Br_2$-$OCOCH_3$	ber. 58,53 C	8,03 H	27,85 Br
$C_{27}H_{45}Br_2$-$OCOCH_3$	„ 59,18 C	8,18 H	27,19 Br
$C_{28}H_{47}Br_2$-$OCOCH_3$	„ 59,78 C	8,25 H	26,54 Br

Reinitzer fand 59,20 C, 8,25 H, 27,19 Br, so daß damit die Formel $C_{27}H_{46}O$ für das Cholesterin gesichert erscheint. In der folgenden Zeit haben zahlreiche Mikroanalysen, die an den verschiedensten Cholesterinderivaten durchgeführt wurden, die Richtigkeit der von Reinitzer aufgestellten Formel erwiesen. Windaus, v. Werder und Gschaider[20]) haben nach der Vorschrift von Vesterberg[21]) die Acetylbestimmung des Cholesterylacetats durchgeführt. Für $C_{27}H_{45}OCOCH_3$ berechnet sich ein Molgewicht 428,4, gefunden wurde 431,2, 433,5, 430,4. Hierdurch wird erneut die Richtigkeit der Formel mit 27 C-Atomen bewiesen.

A II b. Hydroxylgruppe, Doppelbindung und deren relative Lage

Cholesterin enthält eine Hydroxylgruppe. Die Form, in der das Sauerstoffatom im Cholesterin vorliegt, ist schon frühzeitig erkannt worden. Berthelot[22]) konnte das Cholesterin durch Erhitzen mit organischen Säuren in Ester überführen und so zeigen, daß das Cholesterin ein Alkohol ist. Im Laufe der weiteren Untersuchung des Cholesterins sind eine große Anzahl seiner Ester

[18]) Ann. Chim. Phys. 56, 51 (1856).
[19]) Mh. f. Chem. 9, 421 (1888).
[20]) B. 65, 1006 (1932).
[21]) Ark. Kemi. Mineral., Geol. 9, Nr. 27, 1 (1926).
[22]) Ann. chim. phys. 56, 51 (1856).

dargestellt worden[23]). Durch Einwirkung von Phosphorpentachlorid auf Cholesterin erhält man einen Stoff von der Zusammensetzung $C_{27}H_{45}Cl$, das Cholesterylchlorid. In diesem ist die Hydroxylgruppe des Cholesterins durch ein Chlor-Atom ersetzt[24]). Bei der Behandlung des Cholesterylchlorids mit Natrium und Amylalkohol wird das Chlor-Atom gegen Wasserstoff ausgetauscht. Man erhält so den dem Cholesterin entsprechenden Kohlenwasserstoff, das Cholesten $C_{27}H_{46}$[25]). Schließlich sei noch das Natriumcholesterylat erwähnt, das sich bei der Einwirkung von metallischem Natrium auf Cholesterin bildet[26]).

Cholesterin enthält eine Doppelbindung. Die ersten Versuche über den Sättigungsgrad des Cholesterins haben Wislicenus und Moldenhauer[27]) angestellt. Sie fanden, daß Cholesterin ein Mol Brom addiert und in ein gut kristallisiertes Dibromid übergeht. Es muß also eine Doppelbindung enthalten. Diese Doppelbindung ist zu den verschiedensten Anlagerungsreaktionen befähigt. Sie addiert Chlorwasserstoff, man erhält Cholesterin-hydrochlorid $C_{27}H_{47}OCl$[28]). Mit Hilfe von Benzopersäure kann man ein Sauerstoff-

[23]) Cholesterylacetat. Darst. durch Erhitzen von Cholesterin mit Essigsäureanhydrid. Aus Alkohol Nadeln vom Schmp. 114°, $[\alpha]_D = -29{,}8°$ (in Äther). Reinitzer, Mh. f. Ch. 9, 425 (1888). Cholesterylbenzoat. Darst. durch Einwirkung von Benzoylchlorid in Pyridin auf Cholesterin. Aus Alkohol rechtwinklige Tafeln, die bei 145° zu einer trüben Flüssigkeit schmelzen, die bei 180° klar wird. Beim Abkühlen zeigt sich ein prachtvolles Farbenspiel (flüssige Kristalle). Dorée und Gardner, Proc. roy. Soc. 80, 228 (1908). Cholesterylpalmitat. Darst. durch Erhitzen äquimolekularer Mengen von Cholesterin und Palmitinsäure auf 200°. Aus Äther-Alkohol glänzende Blättchen vom Schmp. 79°, $[\alpha]_D = -24{,}2°$ (in Chloroform). Hürthle, H. 21, 342 (1895/96). Salkowski, Arb. a. d. Pathol. Inst. Berlin 1906. Abderhalden und Kautsch, H. 65, 69 (1910). Weitere Ester s. Biochem. Handlexikon (Abderhalden) III, 276; VIII, 480; X, 159; XIV, 806.

[24]) Cholesterylchlorid $C_{27}H_{45}Cl$. Darst. durch Umsetzung von Cholesterin mit PCl_5 oder Thionylchlorid. Aus abs. Alkohol lange Nadeln vom Schmp. 97°, $[\alpha]_D = -26{,}4°$ (in Benzol). Mauthner und Suida, Mh. f. Ch. 15, 87 (1894). Diels und Abderhalden, B. 37, 3102 (1904).

[25]) Cholesten $C_{27}H_{46}$. Aus Alkohol Nadeln vom Schmp. 89/90°, $[\alpha]_D = -56{,}29°$ (in Chloroform). Cholestendibromid $C_{27}H_{46}Br_2$ entsteht durch Einwirkung von Brom in Chloroform auf Cholesten. Zwei Isomere: Blättchen, Schmp. 106°. Nadeln, Schmp. 145/46°. Die Blättchen zeigen Mutarotation in Chloroformlösung: Anfangsdrehung $[\alpha]_D = -39{,}6°$, nach mehreren Tagen $[\alpha]_D = +39{,}4°$. Die Nadeln haben eine konstante Drehung, $[\alpha]_D = +48{,}9°$. Mauthner und Suida, Mh. f. Ch. 15, 90 (1894), 27, 426 (1906).

[26]) Lindemeyer, J. pr. Ch. 90, 326 (1863).

[27]) A. 146, 175 (1868).

[28]) Mauthner, Mh. f. Ch. 27, 305 (1906).

atom addieren, das Reaktionsprodukt ist das Cholesterinoxyd $C_{27}H_{46}O_2$[29]). Wasserstoffsuperoxyd wird von der Doppelbindung aufgenommen, und man bekommt einen dreiwertigen Alkohol, das Cholestantriol $C_{27}H_{48}O_3$. Das gleiche Triol läßt sich auch durch Erhitzen des Cholesterinoxyds mit Wasser gewinnen. Bei der Behandlung von Cholesterin mit Kaliumpermanganat werden ebenfalls die Elemente des Wasserstoffsuperoxyds addiert, doch ist das Reaktionsprodukt stereoisomer zu dem erstgenannten Triol[30]). Die Versuche, Cholesterin mit nascierendem Wasserstoff abzusättigen, blieben dagegen alle ohne Erfolg[31]). Erst nach der Ausarbeitung der katalytischen Hydrierung war es möglich, ein Mol Wasserstoff an die Doppelbindung des Cholesterins zu addieren. Man erhält ein gesättigtes Dihydroderivat, das Dihydrocholesterin oder Cholestanol $C_{27}H_{48}O$[32]). Dieser Stoff erweist sich als beständig gegen Reagenzien, die eine Doppelbindung angreifen. Im Cholesterin ist also nur eine Doppelbindung vorhanden. Der Versuch, die Zahl der Doppelbindungen durch Einwirkung von Ozon zu bestimmen, führt zu abweichenden Ergebnissen, die damit erklärt werden können, daß Ozon bei längerer Einwirkung auch gesättigte Stoffe angreift[33]). Die analogen Experimente lassen sich auch mit Cholesten durchführen. Es gibt ein Cholestendibromid, ein Cholestenhydrochlorid[34]), ein Cholestenoxyd[35]). Aus dem Cholestenoxyd kann man ein Cholestandiol[36]) darstellen. Durch katalytische Hydrierung erhält man einen gesättig-

[29]) Westphalen, B. 48, 1064 (1915).

[30]) Cholestantriol $C_{27}H_{48}O_3$. Aus Methanol Nadeln vom Schmp. 239°. Diacetat Schmp. 165°. Dipropionat Schmp. 172°. Westphalen, B. 48, 1067 (1915), Pickard u. Yates, Soc. 93, 1680 (1908). Isomeres Cholestantriol: Darst. durch Oxydation von Cholesterin mit alkal. Permanganat. Nadeln Schmp. 236°. Diacetat Schmp. 187°. Dipropionat Schmp. 166/67°. Windaus, B. 40, 259 (1907).

[31]) Das gesättigte Produkt, das man bei der Einwirkung von Natrium und Amylalkohol auf Cholesterin erhalten hatte, erwies sich als ein Amylkondensationsprodukt. Siehe Windaus und Uibrig, B. 46, 2487 (1913).

[32]) Cholestanol $C_{27}H_{48}O$ (früher als β-Cholestanol bez.) Darst. durch Hydrierung von Cholesterin mit Platinschwarz und Wasserstoff in Äther-Eisessig oder Äther oder durch Reduktion von Cholestenon mit Natrium und Amylalkohol. Aus Alkohol Blättchen, die bei 141/42° schmelzen. Keine Farbreaktion nach Liebermann-Burchard. $[\alpha]_D = +28{,}8°$. Acetat aus Essigester-Methanol Prismen vom Schmp. 110/11° (korr.) Willstätter und Mayer, B. 41, 2199 (1908). Diels und Abderhalden, B. 39, 889 (1906).

[33]) Z. B. Fürth und Felsenreich, Bio. Z. 69, 416 (1915).

[34]) Mauthner, Mh. f. Ch. 27, 313 (1906), 28, 114 (1908).

[35]) Ruzicka, Furter und Thomann, Helv. Ch. A. 16, 332 (1935).

ten Kohlenwasserstoff $C_{27}H_{48}$, das Cholestan[36]). Den gleichen Kohlenwasserstoff gewinnt man, wenn man im Cholestanol die Hydroxylgruppe gegen Chlor austauscht und durch Reduktion mit Natrium und Amylalkohol das Chloratom durch Wasserstoff ersetzt.

Cholesterin enthält vier Kohlenstoffringe. Im Cholestan haben wir den gesättigten Grundkohlenwasserstoff des Cholesterins vor uns. Er hat die Zusammensetzung $C_{27}H_{48}$, weist also dem entsprechenden Paraffinkohlenwasserstoff $C_{27}H_{56}$ gegenüber ein Defizit von 8 Wasserstoffatomen auf. Da im Cholestan keine Doppelbindung mehr vorhanden ist, muß dieses Defizit durch das Vorhandensein von vier hydrierten Kohlenstoffringen bedingt sein.

Die Hydroxylgruppe ist sekundär und steht in einem Ring. Diels und Abderhalden erhitzten Cholesterin mit Kupferoxyd auf 300° und isolierten einen Stoff von der Zusammensetzung $C_{27}H_{44}O$, dessen Sauerstoffatom als Ketogruppe vorlag[37]). Auf einem etwas anderen Wege kam Windaus zu dem gleichen Stoff[37]). Cholesterindibromid, in dem durch Addition von Brom die Doppelbindung gegen den Angriff des Oxydationsmittels geschützt ist, wurde der Einwirkung von schwefelsaurer Permanganatlösung ausgesetzt. Durch Reduktion mit Zink und Eisessig wurde das Brom wieder entfernt. Das Reaktionsprodukt war mit dem Cholestenon von Diels und Abderhalden identisch. Durch vorsichtige Oxydation mit Chromsäure läßt sich auch das Cholestanol in ein Keton $C_{27}H_{46}O$, das Cholestanon verwandeln[38]). Die sekundäre Hydroxylgruppe muß sich in einem der Kohlenstoffringe befinden, denn Cholesterin geht durch Einwirkung von Natriumhypobromit in eine Dicarbonsäure mit der gleichen Anzahl von C-Atomen, die sog. Diels-Säure $C_{27}H_{44}O_4$, über[39]).

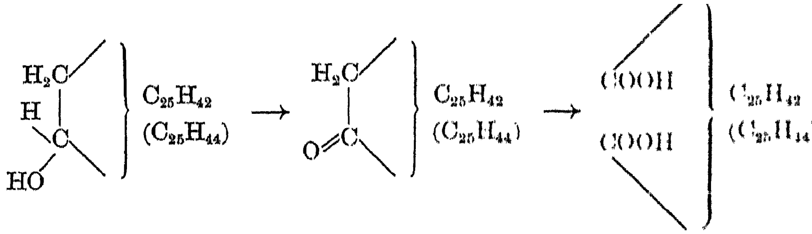
[36]) Cholestan $C_{27}H_{48}$. Aus Äther-Alkohol Blättchen vom Schmp. 80°. $[\alpha]_D = +24{,}4°$ in Chloroform. Mauthner, Mh. f. Ch. 30, 638 (1909). Diels und Linn, B. 41, 548 (1908).

[37]) Cholestenon $C_{27}H_{44}O$. Aus Aceton derbe Prismen vom Schmp. 79/80°. $[\alpha]_D = +88{,}8°$ (Chloroform) Semicarbazon Schmp. 234° (Zers. ab 222°). Oxim Schmp. 152°. Diels und Abderhalden, B. 37, 3099 (1904). Windaus, B. 39, 518 (1906). Diels, A. 459, 21 (1927). Sexton, Soc. 113, 2825 (1928). Ruzicka, Helv. Ch. A. 17, 1412 (1934). Schönheimer, J. biol. Chem. 110, 461 (1935).

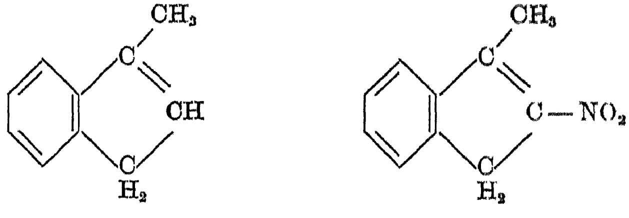
[38]) Cholestanon $C_{27}H_{46}O$. Aus Alkohol Blättchen vom Schmp. 128/29°. Willstätter und Mayer, B. 41, 2199 (1908).

[39]) Diels-Säure $C_{27}H_{44}O_4$. Umkristallisiert aus Eisessig oder Methylaethylketon. Sintert ab 282° und schmilzt bei 290° unter Blasenwerfen. Saurer Methylester: dicke Tafeln aus Alkohol vom Schmp. 124°. Dimethylester: aus

Ganz entsprechend liefert das Cholestanol bei der energischeren Einwirkung von Chromsäure eine Dicarbonsäure $C_{27}H_{46}O_4$, also ebenfalls eine Säure mit der gleichen Anzahl von C-Atomen[40]). Diese Befunde zeigen, daß die Hydroxylgruppe sekundär ist, in einem Ring steht und eine CH_2-Gruppe benachbart hat. Die Vorgänge lassen sich zunächst wie folgt wiedergeben:



Die Doppelbindung des Cholesterins liegt in einem Ring. Bei der Einwirkung von rauchender Salpetersäure auf das Cholesterin und seine Derivate entstehen ungesättigte Nitroverbindungen. Aus Cholesterin entsteht unter gleichzeitiger Veresterung der Hydroxylgruppe ein Nitrocholesterylnitrat ($C_{27}H_{44}NO_2$-ONO_2[41]), aus Cholesterylacetat Nitrocholesterylacetat $C_{27}H_{44}NO_2$-$OCOCH_3$[42]). Cholesterylchlorid liefert Nitrocholesterylchlorid ($C_{27}H_{44}NO_2Cl$[43]) und Cholesten geht in Nitrocholesten über[43]). Analog verlaufende Reaktionen sind bekannt: So liefert das Methylinden bei dieser Reaktion Nitromethylinden[44]). Es wird also bei der Einwirkung der Salpetersäure ein Wasserstoffatom der Doppelbindung durch die Nitrogruppe ersetzt.



Methanol Prismen vom Schmp. 67/69°. Diels und Abderhalden, B. 36, 3179 (1903), 37, 3092 (1904).

40) Dicarbonsäure $C_{27}H_{46}O_4$. Aus Eisessig schmale Tafeln vom Schmp. 196°. Dimethylester aus Methanol Blättchen vom Schmp. 66/67°. Windaus und Uibrig, B. 47, 2387 (1914).

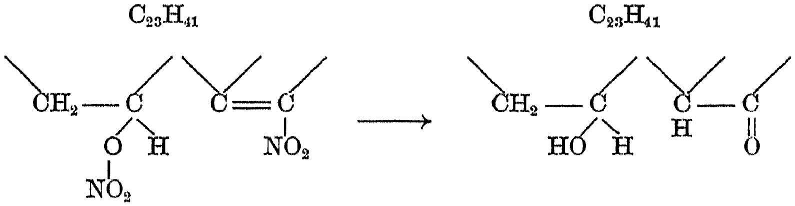
41) Windaus, Habilitationsschrift, Freiburg i. Br. 1903, 9.

42) Mauthner und Suida, Mh. f. Ch. 24, 652 (1904).

43) Mauthner und Suida, Mh. f. Ch. 15, 104 (1894).

44) Wallach, A. 336, 1 (1904).

Bei der Reduktion mit Zinkstaub und Eisessig liefern die Nitroverbindungen gesättigte Ketone. β-Nitroinden geht hierbei in β-Hydrindanon über[44]). Entsprechend erhält man aus Nitrocholesten ein gesättigtes Keton $C_{27}H_{46}O$, das den Namen Heterocholestanon[45]) erhalten hat. Das Nitrocholesterylnitrat bildet bei dieser Reaktion unter gleichzeitiger Verseifung des Salpetersäureesters einen Ketoalkohol $C_{27}H_{46}O_2$[46]).



Aus diesem Ketoalkohol gewinnt man durch Einwirkung von Phosphorpentachlorid einen Stoff von der Zusammensetzung $C_{27}H_{45}OCl$, das sog. β-Chlorcholestanon[47]). In diesem Stoff ist die Hydroxylgruppe des Cholesterins durch ein Chloratom ersetzt worden, und an die Stelle der Doppelbindung ist die Gruppierung des gesättigten Ketons getreten. Das Chlorcholestanon läßt sich durch Oxydation mit rauchender Salpetersäure in eine Chlordicarbonsäure $C_{27}H_{45}ClO_4$ verwandeln[48]), also in eine Säure mit der gleichen Zahl von C-Atomen. Die Ketogruppe des Chlorcholestanons ist aus einem C-Atom der Doppelbindung hervorgegangen, demnach muß die Doppelbindung des Cholesterins in einem Ring liegen. Da die Bildung der Nitroverbindung nur angibt, daß mindestens ein Wasserstoffatom an der Doppelbindung vorhanden ist, sind zwei Möglichkeiten der Formulierung des Vorganges gegeben. Die CH_2-Gruppe, die, nach der Bildung der Dicarbonsäure zu schließen, neben der Ketogruppe sein muß, kann aus einem C-Atom der

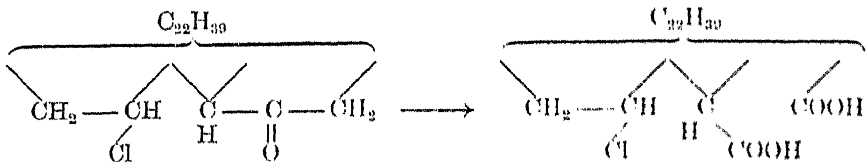
[45]) Heterocholestanon $C_{27}H_{46}O$. (Cholestan-6-on.) Aus Alkohol glänzende Blättchen vom Schmp. 98/99°. Oxim aus Alkohol Nadeln vom Schmp. 195°. Windaus, B. 53, 492 (1920). Windaus und Dalmer, B. 52, 168 (1919).

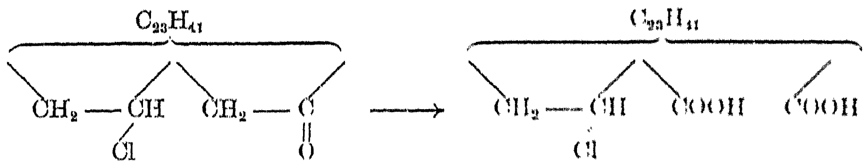
[46]) Cholestanol-on $C_{27}H_{46}O_2$. Aus 75proz. Alkohol feine Nadeln vom Schmp. 142/43°. Acetat: Schmp. 128°. p-Nitrophenylhydrazon: Schmp. 194°. Mauthner und Suida, Mh. f. Ch. 24, 654 (1903). Windaus, B. 36, 3754 (1903).

[47]) β-Chlorcholestanon $C_{27}H_{45}OCl$. Aus Eisessig derbe Nadeln. Schmp. 180/81°. Oxim Nadeln vom Schmp. 179/81°. Windaus und Stein, B. 37, 3702 (1904). α-Chlorcholestanon (Schmp. 128/29°) wurde durch Reduktion von Nitrocholesterylchlorid dargestellt. Es ist ein Stereoisomeres des β-Derivats. Mauthner und Suida, Mh. f. Ch. 24, 656 (1903).

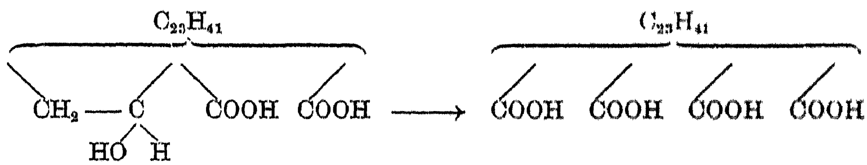
[48]) Windaus und Stein, B. 37, 3704 (1904).

Doppelbindung des Cholesterins hervorgegangen sein oder sie war neben dieser Doppelbindung schon vorhanden.





Hydroxylgruppe und Doppelbindung liegen in verschiedenen Ringen. An diesen Nachweis, daß die Doppelbindung des Cholesterins in einem Ring liegt, läßt sich leicht der Beweis anschließen, daß dieser Ring verschieden von dem ist, der die Hydroxylgruppe trägt. Die Chlordicarbonsäure $C_{27}H_{45}ClO_4$ läßt sich zu einer Oxydicarbonsäure $C_{27}H_{46}O_5$ verseifen. Durch gelinde Oxydation erhält man hieraus zunächst eine Ketodicarbonsäure $C_{27}H_{44}O_5$, die durch weitere Oxydation in eine Tetracarbonsäure $C_{27}H_{44}O_8$ übergeht[49]).



Die Hydroxylgruppe des Cholesterins steht in einem Sechsring. Um die Gliederzahl der Kohlenstoffringe in den Sterinen zu bestimmen, haben *Windaus* und *Dalmer*[50]) die Blancsche Reaktion als diagnostisches Hilfsmittel verwendet. *Blanc*[51]) untersuchte das Verhalten verschiedener gesättigter Dicarbonsäuren gegenüber Essigsäureanhydrid bei höherer Temperatur. Eine 1,4- oder 1,5-Dicarbonsäure liefert beim Erhitzen mit Essigsäureanhydrid auf 240° das innere Anhydrid. 1,6- oder 1,7-Dicarbonsäuren liefern dagegen unter Abspaltung von Kohlendioxyd und Wasser penta- bzw.

[49]) *Windaus* und *Stein*, B. 37, 3705 (1904). *Windaus* und *Deppe*, B. 66, 1563 (1933).

[50]) *Windaus* und *Dalmer*, B. 52, 162 (1919).

[51]) Compt. rend. 144, 1356 (1907).

hexacyclische Ketone. Bernstein- und Glutarsäure bilden also die entsprechenden Anhydride, Pimelin- und Adipinsäure dagegen Cyclopentanon bzw. Cyclohexanon. 1,8-Dicarbonsäuren liefern unter diesen Bedingungen nur geringe Mengen eines heptacyclischen Ketons. Die Voraussetzung für die Verwendung dieser Methode zur Bestimmung der Gliederzahl eines Kohlenstoffringes ist die Übertragbarkeit auf die komplizierteren hydroaromatischen Gebilde. Hierüber liegen bis zur heutigen Zeit eine Reihe von Untersuchungen vor, die im wesentlichen die Blancsche Reaktion geeignet erscheinen lassen[52]). In einigen Fällen hat sie jedoch keine Gültigkeit. So bildet die $\alpha, \alpha, \alpha', \alpha'$-Tetramethyl-adipinsäure unter den Bedingungen der Blancschen Reaktion nur ein stabiles inneres Anhydrid[53]). Auch bei der perhydrierten Diphensäure folgt die Cyclisierung nicht der Blancschen Gesetzmäßigkeit[54]).

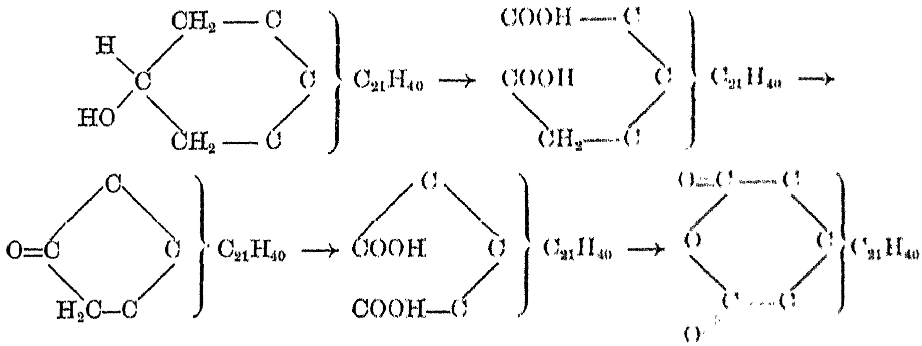
Windaus und Dalmer[50]) erhitzten die oben beschriebene Dicarbonsäure aus Cholestanol mit Essigsäureanhydrid und destillierten das Reaktionsprodukt im Vakuum über. Es erwies sich als ein Keton von der Zusammensetzung $C_{26}H_{44}O$. Durch Oxydation mit Salpetersäure ließ es sich zu einer Dicarbonsäure $C_{26}H_{44}O_4$ aufspalten. Diese neue Dicarbonsäure lieferte nun bei der Durchführung der Blancschen Reaktion ein Säureanhydrid, d. h. in ihr würden sich, wenn die Blancsche Regel gilt, die beiden Carboxyl-Gruppen in 1,5-Stellung befinden. Die Dicarbonsäure aus Cholestanol enthält sie dann in 1,6-Stellung. Danach muß der Ring, aus dem die Dicarbonsäure entstanden ist, ein Sechsring sein. Aus diesen Versuchen geht weiter hervor, daß der Hydroxylgruppe des Cholestanols zwei CH_2-Gruppen benachbart sind, entweder in der Gruppierung: $—CH_2—CH_2—CHOH—$ oder $—CH_2—CHOH—CH_2—$.

[52]) Windaus, Hückel und Reverey, B. 56, 91 (1923). Hückel und Wiebke, B. 59, 2838 (1926).

[53]) Farmer und Kracovski, Soc. 1927, 680.

[54]) Vocke, A. 508, 1 (1934).

Keton $C_{26}H_{44}O$. Darst. durch Erhitzen der Dicarbonsäure aus Cholestanol mit Essigsäureanhydrid und Destillation bei 250° und 15—20 mm Druck. Aus Alkohol glänzende Blättchen vom Schmp. 100—100,5°. Oxim aus Alkohol Nadeln vom Schmp. 203°. Dicarbonsäure $C_{26}H_{44}O_4$. Aus Äther-Benzol Rosetten feiner Nadeln vom Schmp. 234/35°. Die Säure liefert bei der Destillation im Vakuum mit Essigsäureanhydrid eine Substanz von der Zusammensetzung $C_{26}H_{42}O_3$, die sich mit Lauge wieder in die Ausgangssubstanz verwandeln läßt. Es liegt also das Säureanhydrid vor. Aus Petroläther Spieße vom Schmp. 153°.



Weitere Einzelheiten über den Ring, der die Hydroxylgruppe trägt, ergeben sich aus den Untersuchungen, die am Cholestenon durchgeführt wurden.

Cholestenon ist α,β-ungesättigt. Nach Harries[55]) unterscheiden sich die α,β-ungesättigten Ketone von anderen ungesättigten Ketonen dadurch, daß in ihnen die Doppelbindung im allgemeinen reaktionsfähiger ist als die Carbonylgruppe. So kann bei der Behandlung mit Hydroxylamin dieses sich zuerst an die Doppelbindung anlagern, ohne ein Oxim zu liefern. Bei vorsichtiger Reduktion kann man die α,β-ungesättigten Ketone in gesättigte verwandeln. Nebenbei entstehen dimolekulare Produkte, die keine ungesättigten Pinakone, sondern gesättigte Diketone sind. Diels und Abderhalden[56]) konnten neben dem normalen Oxim des Cholestenons ein Produkt fassen, das nach seinem Verhalten das Hydroxylamin-Anlagerungsprodukt darstellt. Sie zogen daraus den Schluß, daß Cholestenon α,β-ungesättigt sei. Die Reduktionsversuche führten aber zu einem anderen Ergebnis. Windaus[57]) reduzierte Cholestenon mit Natriumamalgam in essigsaurer Lösung oder mit Zinkstaub und alkoholischer Salzsäure. In beiden Fällen entstand ein ungesättigtes Pinakon, so daß nach diesem Verhalten Cholestenon nicht α,β-ungesättigt sein konnte. Die sichere Entscheidung hat erst eine optische Untersuchung des Cholestenons erbracht. Im Jahre 1932 zeigten Menschick, Page und Bossert[58]) durch einen Vergleich der Ultraviolettspektren von α,β- und β,γ-ungesättigten Ketonen, daß Cholestenon sich optisch wie ein α,β-ungesättigtes Keton verhält. α,β-ungesättigte Ketone zeigen

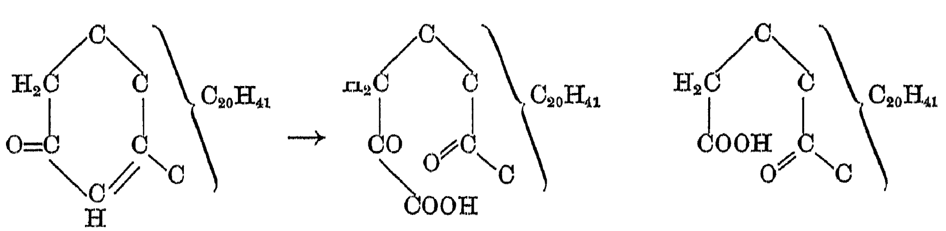
[55]) A. 330, 203 und 212 (1904).
[56]) B. 37, 3099 (1904).
[57]) B. 39, 518 (1906).
[58]) A. 495, 225 (1932).

neben einer sehr niedrigen Bande bei etwa 320 mμ, die der Ketogruppe zuzuschreiben ist, eine sehr hohe Bande bei 240 mμ. Diese fehlt bei gesättigten Ketonen ganz und tritt auch bei Ketonen mit entfernterer Doppelbindung nicht in diesem Wellenlängenbereich auf. Das Cholestenon zeigt eine ausgeprägte Absorptionsbande bei 240 mμ, und auch sein Semicarbazon zeigt die gleiche noch langwelligere Absorption wie die Semicarbazone anderer α,β-ungesättigter Ketone. Cholestenon ist demnach sicher als α,β-ungesättigt anzusehen. Die Bestimmung der Lage der Doppelbindung nach der Reduktionsmethode hatte zu einem unrichtigen Ergebnis geführt.

Ultraviolettabsorption *α,β*-ungesättigter Ketone:

	Lage d. Maximums	Höhe (log k)
Mesityloxyd	235 mμ	4,15
Pulegon	242	3,95
Cholestenon	240	4,21
Mesityloxyd-semicarb.	260	4,08
Pulegon-semicarb.	253	4,04
Cholestenon-semicarb.	273	4,42

Im Cholestenon liegen Doppelbindung und Ketogruppe in einem Ring. Bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat[59]) oder Ozon[60]) zerfällt Cholestenon in der Hauptrichtung in eine Ketocarbonsäure $C_{26}H_{44}O_3$ und Kohlendioxyd. Diesen Abbau kann man mit der α,β-Lage der Doppelbindung des Cholestenons nur vereinbaren, wenn Ketogruppe und Doppelbindung in einem Ring liegen[61]). Primär würde sich eine Diketosäure $C_{27}H_{44}O_4$ bilden, in der eine Ketogruppe in α-Stellung zum Carboxyl steht. Durch weitere Oxydation wird an dieser Stelle ein Mol CO_2 abgespalten und wir bekommen so die Monoketocarbonsäure von der angegebenen Zusammensetzung.



[59]) Windaus, B. 39, 2010 (1906). 50, 133 (1917).
[60]) Dorée und Gardner, Soc. 93, 1330 (1908).
[61]) E. Dane zitiert bei Tschesche, A. 498, 185 (1932).

Ketosäure $C_{26}H_{44}O_3$. Aus Benzol-Petroläther vierseitige Blättchen vom Schmp. 155°. $[\alpha]_D = +37{,}0°$ (in Chloroform). Oxim: aus Alkohol dünne Prismen Schmp. 191°.

Aus diesem Abbau des Cholestenons zu der Ketocarbonsäure folgt weiter, daß ein Kohlenstoffatom der Doppelbindung mit zwei anderen verknüpft ist, von denen eins mit zu dem Ring gehört, in dem auch die Doppelbindung liegt. Damit scheidet die Möglichkeit aus, daß sich ein zweiter Ring spiranartig an dieses C-Atom in dem Ring mit der Ketogruppe im Cholestenon (bzw. der Hydroxylgruppe im Cholesterin) anschließt.

Der Ketogruppe des Cholestenons ist eine CH_2-CH_2-Gruppe benachbart. Die Ketosäure $C_{26}H_{44}O_3$ aus Cholestenon läßt sich, wie Diels gezeigt hat[62]), durch Reduktion nach Clemmensen in eine Carbonsäure $C_{26}H_{46}O_2$ überführen. Unter Verwendung eines Verfahrens, das Wieland, Schlichting und Jacobi[63]) bei dem Abbau der Cholansäure ausgearbeitet haben, gelang es Tschesche[64]), diese Säure um ein C-Atom zu verkürzen und zu einer Säure $C_{25}H_{44}O_2$ zu kommen. Der Abbau läßt sich noch einmal wiederholen und führt zu einer Säure $C_{24}H_{42}O_2$. Damit ist gezeigt, daß sich neben der Ketogruppe des Cholestenons (aus dieser ist die Carboxylgruppe der Säure $C_{26}H_{46}O_2$ entstanden) noch zwei CH_2-Gruppen

[62]) Säure $C_{26}H_{46}O_2$. Aus Eisessig Kristalle vom Schmp. 138°. Diels, Gädcke und Körding, A. 459, 22 (1927).

[63]) H. 161, 80 (1926).

[64]) Der Abbau der Säure $C_{26}H_{46}O_2$ erfolgt über folgende Stufen: Durch Behandlung mit methylalkoholischer Salzsäure stellt man aus der Säure den Methylester dar, setzt diesen mit einer Lösung von Phenylmagnesiumbromid um und gewinnt ein Carbinol von der angegebenen Formel:

$$C_{23}H_{41}-CH_2-CH_2-C\begin{matrix}\nearrow O\\ \searrow OCH_3\end{matrix} \longrightarrow C_{23}H_{41}-CH_2-CH_2-C\begin{matrix}\nearrow C_6H_5\\ -OH\\ \searrow C_6H_5\end{matrix}$$

Das Carbinol spaltet leicht Wasser ab und geht in einen ungesättigten Kohlenwasserstoff über, der bei der Ozonisierung und Nachoxydation mit Chromsäure die Säure $C_{25}H_{44}O_2$ liefert.

$$C_{23}H_{41}-CH_2-\underset{H}{C}=C\begin{matrix}\nearrow C_6H_5\\ \searrow C_6H_5\end{matrix} \longrightarrow C_{23}H_{41}-CH_2-COOH$$

Aus Aceton umkristallisiert bildet die Säure Prismen mit dachförmiger Endigung, die bei 153/54° schmelzen. $[\alpha]_D = +45{,}7°$. Das Anilid schmilzt bei 149/150°.

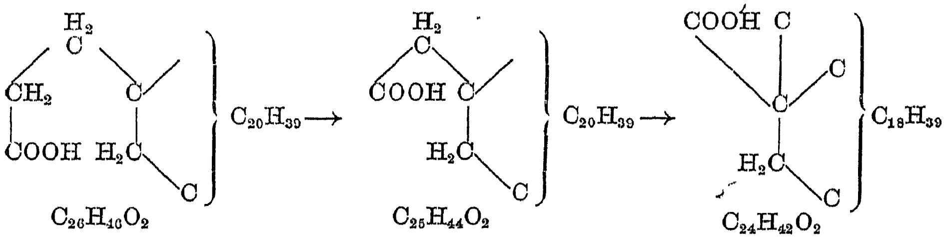
Säure $C_{24}H_{42}O_2$: Die Darstellung erfolgt ganz analog über Methylester der Säure $C_{25}H_{44}O_2$, Diphenyl-Carbinol, ungesättigten Kohlenwasserstoff und Ozonabbau desselben. Aus Aceton umkristallisiert bildet sie derbe Prismen vom Schmp. 181/82°. $[\alpha]_D = +15{,}6°$. Das Anilid schmilzt bei 105/08°.

Tschesche, A. 498, 191 (1932).

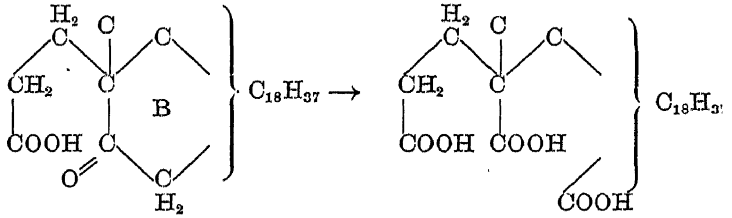
befinden. Die Säure mit 24 C-Atomen ist im Gegensatz zu den beiden anderen Säuren schwer veresterbar, und der aus ihr dargestellte Ester ist schwer verseifbar. Äquimolekulare Mengen von der entsprechenden Säure und Isobutylalkohol wurden 1 Stunde auf 155° erhitzt. Dabei lieferte:

die Säure	$C_{26}H_{46}O_2$	29,6	Proz. Ester
„ „	$C_{25}H_{44}O_2$	22,6	„ „
„ „	$C_{24}H_{42}O_2$	0,9	„ „

Diese sehr geringe Veresterungsgeschwindigkeit der Säure $C_{24}H_{42}O_2$ legt die Annahme nahe, daß die Carboxylgruppe an einem quartären C-Atom haftet. In Übereinstimmung damit[65]) spaltet die Säure bei der Behandlung mit konz. Schwefelsäure leicht Kohlenoxyd ab.



Mit Ring A ist ein zweiter Ring kondensiert. Der Sechsring, in dem die Hydroxylgruppe des Cholesterins bzw. die Ketogruppe des Cholestenons steht, wird weiterhin als Ring A bezeichnet. Mit ihm ist ein zweiter Ring kondensiert, denn die Ketosäure $C_{26}H_{44}O_3$ läßt sich durch Oxydation mit Natriumhypobromit in eine Tricarbonsäure $C_{26}H_{44}O_6$, also mit der gleichen Zahl von C-Atomen, verwandeln[66]). Die Ketogruppe der Säure $C_{26}H_{44}O_3$ befindet sich demnach in einem Kohlenstoffring und hat eine CH_2-Gruppe benachbart. Da eine spiranartige Verknüpfung ausgeschlossen ist, muß der zweite Ring ein weiteres C-Atom mit dem Ring A gemeinsam haben, er ist mit ihm kondensiert. Dieser mit Ring A kondensierte Ring wird als Ring B bezeichnet.



[65]) Bistrzycki und Bernhardi, B. 24, 2209 (1891).
[66]) Windaus, B. 39, 2013 (1906).

Bei der Bildung des Cholestenons verschiebt sich die Doppelbindung. Wir hatten schon oben festgestellt, daß Cholesterin Hydroxylgruppe und Doppelbindung im Gegensatz zum Cholestenon in verschiedenen Ringen trägt. Man darf demnach aus der α,β-Lage der Doppelbindung im Cholestenon keine Rückschlüsse auf die Lage der Doppelbindung im Cholesterin ziehen und hierfür ebenfalls die α,β-Lage annehmen. Für diese Tatsache der Verschiebung der Doppelbindung bei der Bildung des Cholestenons aus dem Cholesterin lassen sich noch andere Experimente anführen.

Wenn man aus dem oben erwähnten Cholestenhydrochlorid wieder Chlorwasserstoff abspaltet, so erhält man nicht Cholesten zurück, sondern bekommt einen isomeren Kohlenwasserstoff, den Mauthner[67]) Pseudocholesten genannt hat. Dieser Kohlenwasserstoff enthält seine Doppelbindung in einer anderen Lage als das Cholesten, stimmt aber sonst strukturell mit ihm überein, denn durch Hydrierung kann man ihn in das gleiche Cholestan verwandeln, das man auch aus Cholesten erhält[68]). Cholestenon läßt sich über sein Semicarbazon durch Reduktion nach Wolf-Kishner in einen Kohlenwasserstoff verwandeln, der mit dem Pseudocholesten[69]) identisch ist. Dem Cholestenon entspricht also ein anderer ungesättigter Kohlenwasserstoff als dem Cholesterin. Voraussetzung hierfür ist, daß im Cholesten die Doppelbindung tatsächlich an der gleichen Stelle liegt wie im Cholesterin. Der Beweis hierfür wird weiter unten angegeben.

Bei der Abspaltung von Chlorwasserstoff aus dem Cholesterinhydrochlorid erhält man analog zu der Reaktion des Cholesten-hydrochlorids nicht Cholesterin zurück, sondern ein Isomeres des Cholesterins, das sog. Allocholesterin[70]), das sich sehr leicht durch Erhitzen

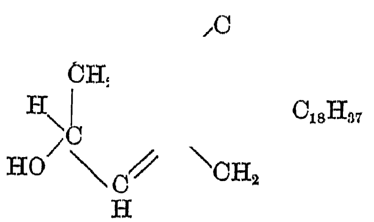
[67]) Pseudocholesten. $C_{27}H_{46}$. Darst. durch Erhitzen von Cholesten mit einem Zehntel seines Gewichts an Cholestenhydrochlorid. Oder durch Erwärmen von Cholestenhydrochlorid mit einer alkoholischen Kaliumacetatlösung. Aus Alkohol umkristallisiert. Schmp. 79/80°. $[\alpha]_D = +61,86°$. Das Dibromid entsteht durch Zugabe einer Brom-Eisessiglösung zu der ätherischen Lösung von Pseudocholesten. Aus Äther-Alkohol umkristallisiert flache Nadeln vom Schmp. 116/17°. Es zeigt in Chloroformlösung Mutarotation. Die Drehung steigt im Laufe einiger Tage von +38,7° bis +83,4°. Mauthner, Mh. f. Ch. 28, 1113 (1907). Schulze, Diss. Göttingen 1928.

[68]) Windaus, B. 52, 174 (1919).

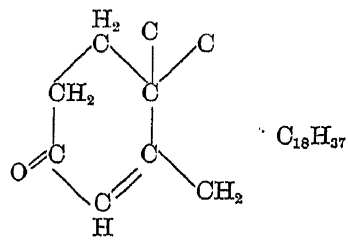
[69]) Lettré, H. 221, 73 (1933).

[70]) Allocholesterin $C_{27}H_{46}O$. Darst. durch Erwärmen von Cholesterin-Hydrochlorid mit einer Lösung von wasserfreiem Kaliumacetat in abs. Alkohol. Aus Aceton umkristallisiert büschelförmig angeordnete Nadeln vom Schmp. 117°. Bei der Bromierung erhält man das normale Cholesterindi-

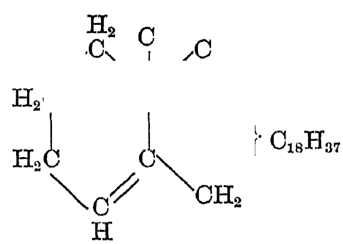
in siedendem Xylol, durch Spuren von Säuren und in der Berührung mit einem Platinkatalysator wieder in Cholesterin zurückverwandelt. Durch vorsichtige Dehydrierung mit Chromsäure geht das Allocholesterin in Cholestenon[71]) über. Cholestenon ist also das dem Allocholesterin entsprechende Keton (Cholesterin liefert bei der Chromsäureoxydation andere Produkte, s. u.). Umgekehrt kann man durch Reduktion von Cholestenon mit Aluminium-isopropylat wieder Allocholesterin erhalten[72]). Im Allocholesterin, Cholestenon und Pseudocholesten liegt die Doppelbindung an der gleichen Stelle des Moleküls. Diese ist aber von der Lage der Doppelbindung im Cholesten und Cholesterin verschieden.



Allo-cholesterin



Cholestenon



Pseudo-cholesten

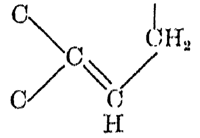
C h o l e s t e r i n i s t β, γ - u n g e s ä t t i g t. Die leichte Verschiebbarkeit der Doppelbindung bei der Bildung des α,β-ungesättigten Cholestenons aus Cholesterin läßt sich am ehesten aus einer β,γ-Lage der ursprünglichen Doppelbindung verstehen. Hierfür lassen sich eine Reihe von Beweisen anführen. Wenn die Doppelbindung tatsächlich in β,γ-Stellung zur Hydroxylgruppe vorhanden ist, muß sie nach den bis-

bromid, bei der Acetylierung mit siedendem Essigsäureanhydrid Cholesterylacetat. Allocholesterin fällt mit Digitonin, liefert aber bei der Extraktion des Digitonids mit Xylol Cholesterin zurück. Nach der Pyridin-Äther-Methode kann man das Allocholesterin aus dem Digitonid wiedergewinnen. W i n d a u s, A. 453, 101 (1927).

[71]) B o n s t e d t, H. 214, 173 (1932).

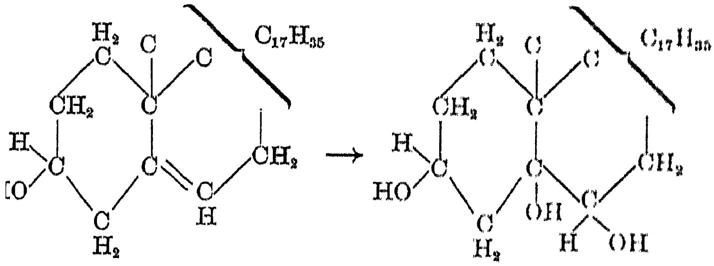
[72]) Unveröffentlicht.

herigen Feststellungen über die Konstitution des Cholesterins in der Gruppierung



vorliegen. Neben der Doppelbindung muß eine CH_2-Gruppe sein, da sich das Chlorcholestanon, dessen Ketogruppe aus einem C-Atom der Doppelbindung (aus dem mit dem Wasserstoffatom) hervorgegangen ist, in eine Dicarbonsäure mit der gleichen Zahl von C-Atomen verwandeln läßt (s. oben).

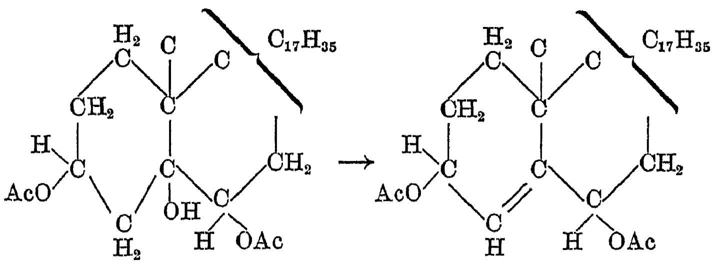
Das Cholestantriol, das durch Addition von zwei Hydroxylgruppen an die Doppelbindung entstanden ist, sollte dann eine tertiäre und zwei sekundäre Hydroxylgruppen enthalten. In Übereinstimmung damit liefert es bei der Veresterung z. B. mit Essigsäure nur ein Diacetat[73]). Versucht man durch Anwendung energischerer Bedingungen die Veresterung der dritten Hydroxylgruppe zu erzwingen, so spaltet sich Wasser ab und man bekommt das Diacetylderivat eines ungesättigten Diols. Cholestantriol enthält also eine sehr schwer veresterbare Hydroxylgruppe, die leicht unter Bildung einer Doppelbindung als Wasser abgespalten wird[73]). Entsprechend erhält man bei der Oxydation des Cholestantriols kein Triketon, sondern ein Oxy-diketon, das Cholestandion-ol[74]). Eine Hydroxylgruppe des Cholestantriols ist nach ihren Reaktionen tertiär. Sie liegt wahrscheinlich an der Verknüpfungsstelle von Ring A und B.



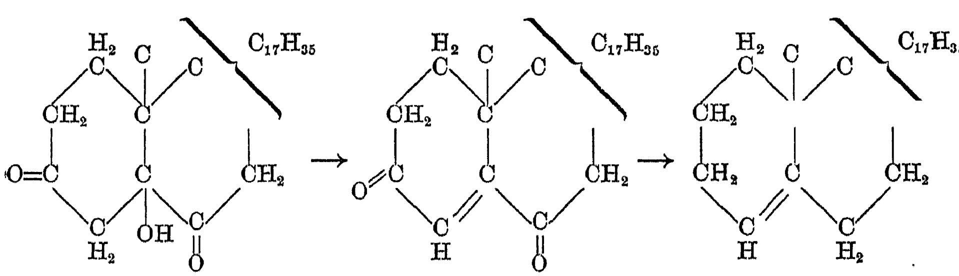
Cholesterin — Cholestantriol

[73]) Westphalen, B. 48, 1067 (1915). Bei der Behandlung von Cholestantrioldiacetat mit Essigsäureanhydrid und einigen Tropfen konz. Schwefelsäure entsteht Cholestendioldiacetat. Aus Methanol Blättchen vom Schmp. 125°. S. a. Soc. 1934, 1580.

[74]) Pickard und Yates, Soc. 93, 1684 (1908).



Das Cholestan-dion-ol spaltet bei der Behandlung mit Chlorwasserstoff leicht ein Molekül Wasser ab und geht in ein Cholesten-dion über[75]). Der gleiche Stoff entsteht auch als Hauptprodukt bei der Chromsäureoxydation des Cholesterins. Mauthner[76]) hat diesen Stoff (fälschlich!) als Oxycholestenon bezeichnet. Reduziert man das Oxycholestenon über sein Di-semicarbazon nach Wolf-Kishner, so erhält man einen Kohlenwasserstoff, der mit Pseudocholesten identisch ist[77]). Damit ist die Annahme, daß die tertiäre Hydroxylgruppe des Cholestantriols an der Verknüpfungsstelle von Ring A und B steht, bewiesen. Die beiden Ketogruppen des Oxycholestenons müssen sich danach in 1,4-Stellung zueinander befinden. Die Richtigkeit dieser Behauptung läßt sich noch auf andere Weise zeigen.



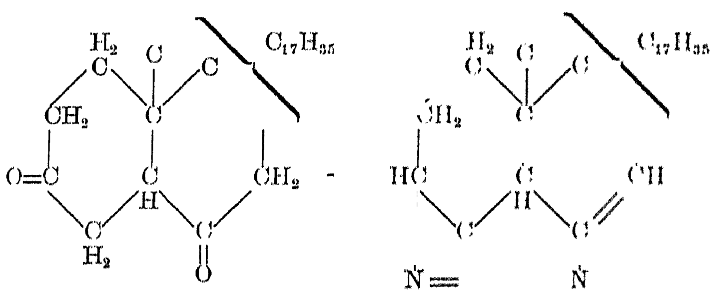
Cholestan-dion-ol Oxy-cholestenon Pseudocholesten

[75]) Windaus, B. 40, 261 (1907).

[76]) Cholestendion (Oxycholestenon) $C_{27}H_{42}O_2$. Aus verd. Alkohol glänzende, schwachgelbe Blättchen, Schmp. 122/23°. Monophenylhydrazon, goldgelbe Nadeln vom Schmp. 271°. Monohydrazon, gelbe Blättchen vom Schmp. 160/61°. Monosemicarbazon Schmp. 245°. Disemicarbazon Schmp. 288°. Oxycholestenon reagiert als Enol und läßt sich mit 20proz. Kalilauge aus seiner ätherischen Lösung ausschütteln. Es bildet sich ein schwerlösliches gelbgefärbtes Kalisalz, das mit Wasser Oxycholestenon zurückliefert. Mit alkoholischer Salzsäure entsteht ein Enoläther. Mauthner und Suida, Mh. f. Ch. 17, 584 (1896). Windaus, B. 40, 261 (1907).

[77]) Stange, H. 223, 245 (1934).

Für 1,3- und 1,4-Diketone ist es charakteristisch, daß sie mit einem Molekül Hydrazin unter Wasseraustritt reagieren und dabei Pyrazol- bzw. Pyridazinderivate bilden. Das Oxycholestenon läßt sich mit Hilfe von Zinkstaub und Eisessig hydrieren und liefert hierbei ein gesättigtes Keton, das Cholestandion[78]). Den gleichen Stoff erhält man durch Chromsäureoxydation des Cholestanol-ons, das aus dem Nitro-cholesterylnitrat dargestellt ist. Das Cholestan-dion geht nun bei der Behandlung mit Hydrazin in ein Kondensationsprodukt von der Zusammensetzung $C_{27}H_{44}N_2$ über[79]). Das Cholestan-dion kann kein 1,3-Diketon sein, wir haben also ein 1,4-Diketon vor uns, das mit Hydrazin ein Pyridazinderivat gebildet hat. Hiermit in Übereinstimmung steht die Tatsache, daß durch Addition von Brom an die Doppelbindung des Oxycholestenons das gleiche Dibromid gebildet wird, das auch durch Substitution aus Cholestandion entsteht[80]).



Aus diesen Untersuchungen ergibt sich einwandfrei, daß das C-Atom der Doppelbindung, das ein Wasserstoff-Atom trägt, in 4- oder γ-Stellung zur Hydroxylgruppe des Cholesterins steht. Das andere C-Atom steht aber, wie der Übergang Cholestantriol-Oxycholestenon-Pseudocholesten zeigt, an der Verknüpfungsstelle von Ring A und B, also in β-Stellung zum Hydroxyl. Cholesterin ist β,γ-ungesättigt.

Cholesten ist der dem Cholesterin entsprechende Kohlenwasserstoff. Cholesten liefert bei der Oxydation mit Chromsäure als neutrales Reaktionsprodukt ein ungesättigtes Keton,

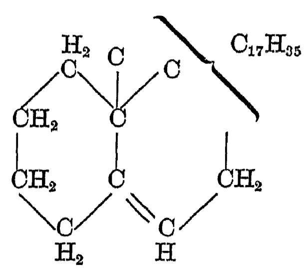
[78]) Cholestandion $C_{27}H_{44}O_2$ Aus Alkohol farblose Nadeln vom Schmp. 169°. Dioxim: Schmp. 205° u. Z. Windaus, B. 36, 3755 (1903), 39, 2252 (1906).

[79]) $C_{27}H_{44}N_2$. Aus Alkohol Blättchen vom Schmp. 188°. Windaus, B. 37, 2256 (1904).

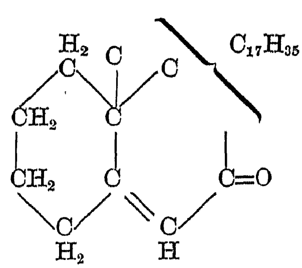
[80]) Mauthner und Suida, Mh. f. Ch. 17, 588 (1896). Windaus, B. 37, 2031 (1904).

[81]) Oxocholesten $C_{27}H_{44}O$. Aus Alkohol Blättchen vom Schmp. 125°. Semicarbazon aus Methanol Nädelchen, die bei 225° unter Zersetzung schmelzen. Das Ultraviolettspektrum des Oxocholestens zeigt ein Maximum bei

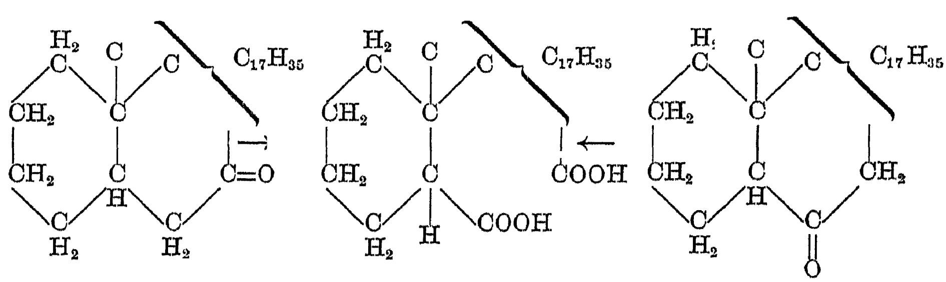
das sog. Oxocholesten[81]). Durch katalytische Hydrierung läßt sich dieses in das gesättigte Keton, Oxocholestan genannt, überführen. Nach manchen Analogien[82]) kann man annehmen, daß bei der Bildung des Oxocholestens die CH_2-Gruppe in α-Stellung zur Doppelbindung in die Ketogruppe verwandelt worden ist. Hierfür spricht der Befund, daß das Oxocholesten nach seinem Ultraviolettspektrum ein α,β-ungesättigtes Keton ist. Daß die neue Ketogruppe in dem Ring B entstanden ist, läßt sich folgendermaßen zeigen: Das Heterocholestanon (aus Nitrocholesten) ist verschieden von dem Oxocholestan. Durch Oxydation mit Salpetersäure kann man aber beide Ketone in die gleiche Dicarbonsäure $C_{27}H_{46}O_4$ überführen. Die Konstitution des Heterocholestanons ergibt sich nach seiner Entstehung aus Cholesten nach Formel B. Dann muß das Oxocholestan Formel A haben. Voraussetzung für die richtige Aufstellung der Formel des Heterocholestanons ist die gleiche Lage der Doppelbindungen im Cholesten und Cholesterin. Dieser Beweis läßt sich, nachdem wir das Oxocholestan kennen, leicht führen.



Cholesten



Oxo-cholesten



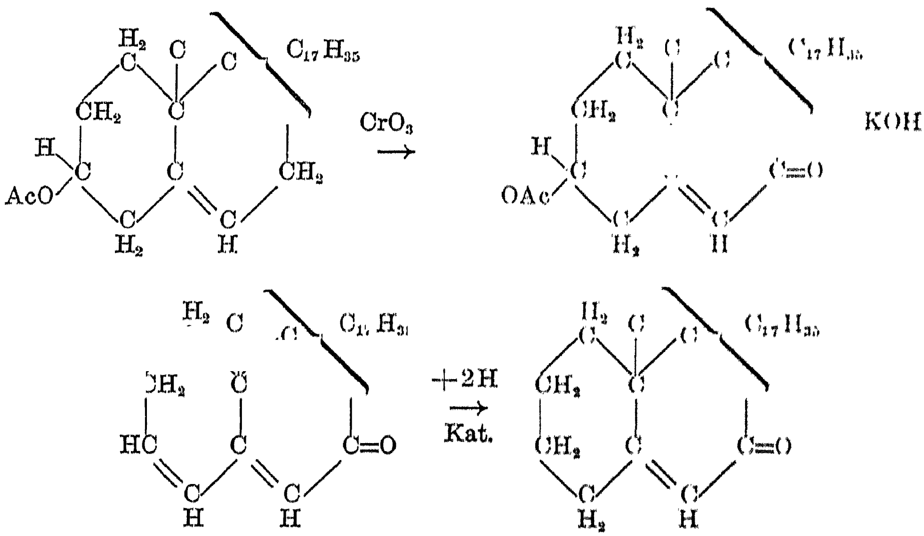
A: Oxo-cholestan

B: Hetero-cholestanon

248—254 mμ. Windaus, B. 53, 495 (1920). Oxocholestan $C_{27}H_{46}O$. Schmp. 108/09°. Liefert bei der Oxydation mit Salpetersäure die Dicarbonsäure $C_{27}H_{46}O_4$, die auch aus Heterocholestanon entsteht. Windaus, B. 53, 496 (1920).

[82]) Blumau und Zeitschel, B. 47, 2624 (1914). Willstätter und Sonnenfeld, B. 46, 2953 (1913). Semmler, B. 47, 1143 (1914).

Unter den Einwirkungsprodukten von Chromsäure auf Cholesterylacetat findet sich ein Stoff von der Zusammensetzung $C_{27}H_{43}$-O-OCOCH$_3$, der eine Ketogruppe enthält[84]). Es ist also wieder Umwandlung einer CH$_2$-Gruppe in eine Ketogruppe eingetreten. Mit alkoholischem Alkali spaltet der Stoff Essigsäure ab und geht in ein doppelt ungesättigtes Keton $C_{27}H_{42}O$, das sog. Oxycholesterylen über[84]). Dieses Keton kann man leicht katalytisch hydrieren, und zwar erhält man durch Aufnahme von einem Mol Wasserstoff das Oxocholesten, bei weiterer Hydrierung das Oxocholestan. Aus diesen Untersuchungen am Oxocholesten, Oxocholestan, Heterocholestanon und Oxycholesterylen ergibt sich also, daß die Doppelbindungen des Cholestens und Cholesterins gleich liegen und eine CH$_2$-Gruppe benachbart haben.



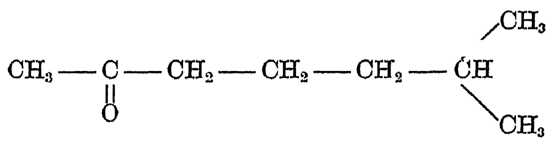
A II c. Die Seitenkette des Cholesterins

Cholesterin enthält eine Seitenkette C_8H_{17}. Erhitzt man Cholesterylchlorid etwas über den Schmelzpunkt, so tritt eine lebhafte Entwicklung von Chlorwasserstoff ein, die längere Zeit andauert.

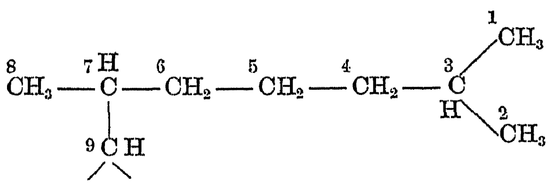
[83]) Dicarbonsäure $C_{27}H_{46}O_4$ (aus Heterocholestanon). Aus Eisessig glänzende Nadeln vom Schmp. 273°. Das Anhydrid bildet aus Aceton umkristallisiert lange Nadeln vom Schmp. 118°. Windaus, B. 52, 169 (1919).

[84]) 7-Ketocholestenolacetat (β-Oxycholestenolacetat) $C_{27}H_{43}OOCOCH_3$. Aus Alkohol Täfelchen vom Schmp. 152/53°. Durch Verseifung mit methylalkoholischem Natriummethylat entsteht Ketocholestenol. Nadeln vom Schmp. 157°. Mauthner und Suida, Mh. f. Ch. 17, 592 (1896). Oxycholesterylen $C_{27}H_{42}O$. Aus Alkohol Blättchen vom Schmp. 112°. Mauthner und Suida, Mh. f. Ch. 17, 596 (1896). Übergang in Oxocholesten und Oxocholestan: Windaus und Kirchner, B. 53, 619 (1920).

Nach Beendigung der Gasentwicklung steigert man die Temperatur. Es destilliert zunächst eine farblose, leicht bewegliche Flüssigkeit über (bei ca. 150°). Dieser Stoff wurde als ein Gemisch von Iso-oktan und Okten erkannt. Bei Steigerung der Temperatur auf 360° geht ein dickflüssiges Öl über. Nach Analyse und Molgewichtsbestimmung, die an dem öligen Produkt durchgeführt wurden, hat dieser Stoff die Zusammensetzung $C_{19}H_{28}$[85])[86]). Augenscheinlich ist das Oktan und Okten durch Abspaltung einer Seitenkette aus dem Cholesterin entstanden. Windaus und Resau[87]) gelang es, bei der Einwirkung von Chromsäure auf Cholesterin ein wasserdampfflüchtiges Keton zu isolieren. Es konnte in der Form des Semicarbazons mit dem Semicarbazon des Methylisohexylketons identifiziert werden.



Im Cholesterin muß also eine Seitenkette C_8H_{17} vorhanden sein, deren Konstitution in der folgenden Formel angegeben ist. Eine Reihe von niedrigmolekularen Produkten, die sich bei energischer Oxydation des Cholesterins mit Salpetersäure oder anderen Oxydationsmitteln bilden, lassen sich leicht von dieser Oktylseitenkette ableiten[88]):



Aceton aus C-Atom 1—3, Dinitro-isopropan aus 1—3, α-Oxy-isobuttersäure aus C-Atom 1—5, Bernsteinsäure aus C-Atom 4—7, Methylbernsteinsäure aus C-Atom 5—9 und α-Methylglutarsäure aus C-Atom 4—9. Ruzicka[89]) ist es gelungen, auch das andere Spaltstück bei der Bildung des Methylisohexylketons zu fassen. Bei der Chromsäureoxydation des Cholestanol-acetats konnte aus dem neutralen Anteil über das Semicarbazon ein Stoff von der Zusammensetzung $C_{19}H_{30}O_2$, ein Oxyketon isoliert werden. Der entsprechende Kohlenwasserstoff hätte

[85]) Mauthner und Suida, Mh. f. Ch. 17, 41 (1896).
[86]) Fischer und Treibs, A. 446, 257 (1926).
[87]) Windaus und Resau, B. 46, 1246 (1913). Methylisohexylketon wurde als Semicarbazon vom Schmp. 154° erhalten.
[88]) Windaus, B. 41, 2558 (1908). B. 42, 3772 (1909). B. 45, 2422 (1912). H. 102, 160 (1918).

die Zusammensetzung $C_{19}H_{32}$, d. h. der Stoff enthält vier Ringe. In ihm haben wir eine Substanz mit den vier Ringen des Cholesterins ohne die Seitenkette vor uns.

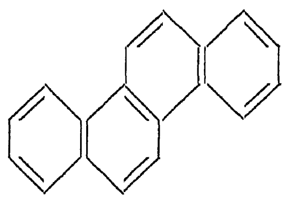
A II d. Das Vierringskelett

S e l e n d e h y d r i e r u n g d e s C h o l e s t e r i n s. Bei der Dehydrierung des Cholesterins mit Palladiumkohle oder Selen bei höherer Temperatur (400°) wurde von D i e l s und Mitarbeitern[90]) zuerst als definiertes Produkt neben einer Reihe von anderen aromatischen Kohlenwasserstoffen Chrysen isoliert. Wir müssen heute annehmen, daß dieses Chrysen durch eine Pyrosynthese oder Umlagerung anderer Dehydrierungsprodukte entstanden ist. Bei etwas niederen Temperaturen (320°) erhält man als charakteristisches Produkt einen Kohlenwasserstoff $C_{18}H_{16}$[91]). Die Konstitution dieses Kohlenwasserstoffs ist durch die Synthese einwandfrei gesichert. Er ist ein γ-Methyl-cyclopentenophenanthren:

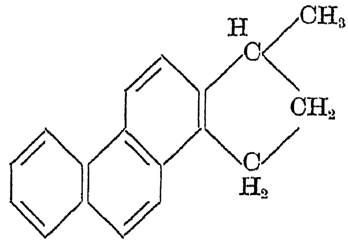
[89]) Oxyketon $C_{19}H_{30}O_2$ aus Cholestanol. Cholestanolacetat wird mit überschüssiger Chromsäure oxydiert. Aus dem neutralen Anteil entsteht nach Abtrennung von unverändertem Cholestanolacetat durch Behandlung mit Semicarbazidacetat ein schwer lösliches Semicarbazon vom Schmp. 261/62°. Es hat die Zusammensetzung $C_{22}H_{35}O_3N_2$, d. h. es liegt das Semicarbazon eines acetylierten Oxyketons vor. Durch Spaltung des Semicarbazons mit Eisessig-Salzsäure gewinnt man bei gleichzeitiger Verseifung des Acetatrestes das freie Oxyketon. Schmp. 174/174,5°. $[\alpha]_D$ = + 87,5° (in Methanol). R u z i c k a u. s. Helv. Ch. A. 17, 1389 (1934).

[90]) Chrysenbildung bei der Dehydrierung von Cholesterin, Cholesterinderivaten und Cholsäure: D i e l s und G ä d k e, B. 58, 1231 (1925). B. 60, 140 (1927). D i e l s, G ä d k e und K ö r d i n g, A. 459, 11 (1927). D i e l s und K a r s t e n s, A. 478, 135 (1930). R u z i c k a und Mitarb. Helv. Ch. A. 17, 200 (1934).

[91]) Kohlenwasserstoff $C_{18}H_{16}$. Darst. durch Einwirkung von Selen auf Cholesterin, Cholsäure und Derivate bei 320—340°. Aus der Fraktion der Reaktionsprodukte, die bei 12 mm Druck zwischen 200 und 220° destilliert. Aus Alkohol umkristallisiert schneeweiße, glänzende Blättchen, die violette Fluorescenz zeigen. Schmp. 124/25°. Pikrat Schmp. 117/18°. Trinitrobenzolat Schmp. 145/46°. Trinitrotolat Schmp. 93°. Verbindung $C_{18}H_{13}O_2N$ (durch Erwärmen des Einwirkungsprodukts von nitrosen Gasen auf $C_{18}H_{16}$ mit Ameisensäure oder Pyridin): Aus Eisessig olivbraune Blättchen vom Schmp. 238/40° bei raschem Erhitzen. Tribromid durch Einwirkung von Brom in Tetrachlorkohlenstoff auf $C_{18}H_{16}$. Aus Tetrachlorkohlenstoff gelbe Nadeln, die sich bei 235° zersetzen. D i e l s, G ä d k e und K ö r d i n g, A. 459, 1 (1927). D i e l s und K a r s t e n s, A. 478, 129 (1930). R u z i c k a und T h o m a n n, Helv. Ch. A. 16, 216 (1933), 16, 812 (1933). D i e l s und R i c k e r t, B. 68, 267 (1935).

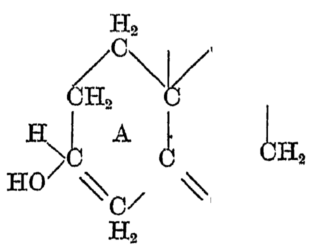


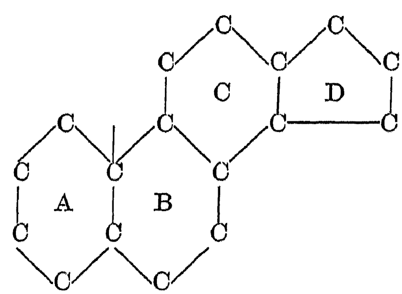
Chrysen.



γ-Methyl-cyclopenteno-phenanthren.

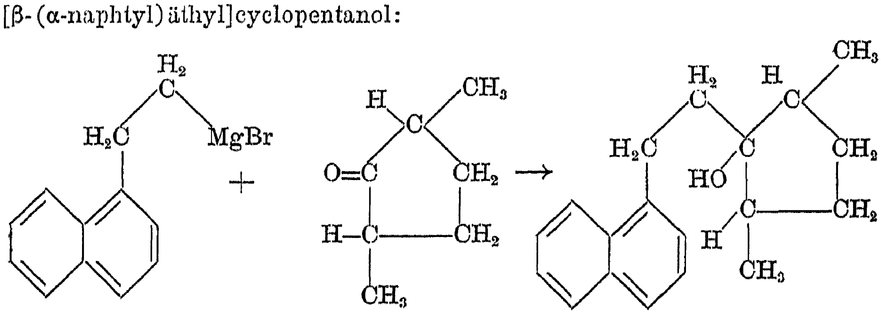
Von den vier Ringen des Cholesterins sind also drei Sechsringe und einer ist ein Fünfring. Die drei Sechsringe sind phenanthrenartig miteinander verknüpft, mit einem der Sechsringe ist der Fünfring kondensiert. Der bis jetzt festgelegte Teil des Cholesterinmoleküls läßt sich nur an einer einzigen Stelle in diesem Vierringskelett unterbringen:



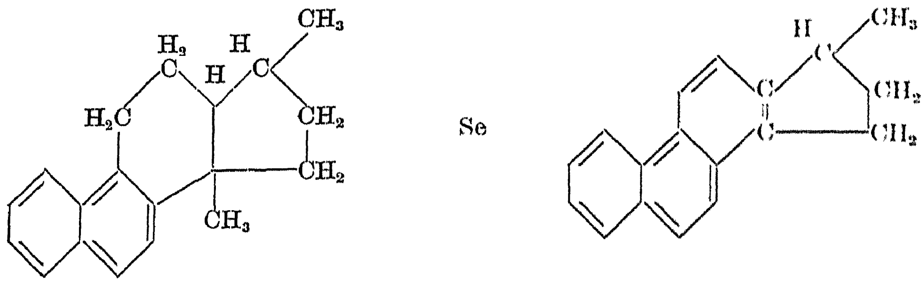


Der Ring B des Cholesterins ist also auch ein Sechsring, ihm schließt sich der dritte Sechsring, Ring C, phenanthrenartig an. Mit dem Ring C ist der Fünfring, Ring D, kondensiert. Es bleibt nun noch die Aufgabe, den Ort der Verknüpfung der Seitenkette mit den 8 C-Atomen an dieses Vierringskelett zu bestimmen und die restlichen beiden C-Atome unterzubringen.

Die Synthese des Kohlenwasserstoffs wurde von H a r p e r, K o n und F. C. J. R u z i c k a (Soc. 1934, 124) auf folgende Weise durchgeführt: 2,5-Dimethylcyclopentanon wurde mit der Magnesiumverbindung des β-(α-Naphtyl)-Äthylbromids umgesetzt. Man bekommt auf diese Weise das 2,5-Dimethyl-1-[β-(α-naphtyl)äthyl]cyclopentanol:

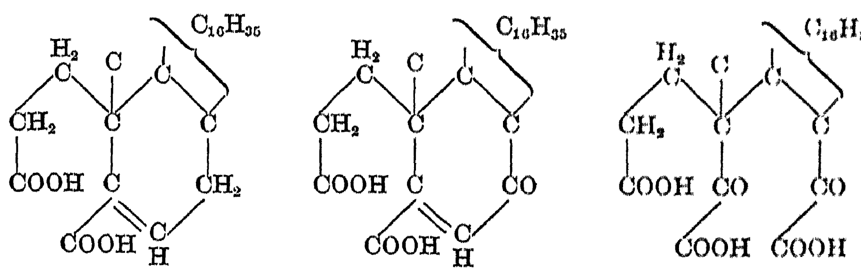


Durch Erhitzen mit Phosphorpentoxyd auf 140° spaltet dieser Stoff unter gleichzeitiger Cyclisierung Wasser ab und geht in das 1,γ-Dimethyl-1,2-cyclopentano-1,2,3,4-tetrahydrophenanthren über:



Durch Selendehydrierung liefert dieser Stoff unter Abspaltung der Methylgruppe an 1 das γ-Methyl-cyclopenteno-phenanthren. Die Identität mit dem aus Cholesterin gewonnenen Kohlenwasserstoff wurde durch kristallographischen Vergleich, durch Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt, durch Darstellung des Pikrats, des Additionsproduktes mit Trinitrobenzol und mit Trinitrotoluol und schließlich durch die Untersuchung der Ultraviolettspektren sichergestellt. Diels und Rickert, B. 68, 267 (1935), haben weiter noch aus beiden Stoffen die charakteristische Tribromverbindung dargestellt, die ebenfalls völlig übereinstimmte. Zur Synthese s. a. Bergmann und Hillemann, B. 66, 1302 (1933).

Mit dieser Formulierung des Cholesterins steht in bester Übereinstimmung ein Abbau, der von Windaus durchgeführt wurde, der zugleich Auskunft über die Konstitution der sog. Dielssäure und ihres Hydrierungsproduktes, der Dihydrodielssäure, gibt. Die Dielssäure läßt sich über eine ungesättigte Ketodicarbonsäure in eine Diketotricarbonsäure $C_{27}H_{42}O_8$ verwandeln (s. Formel I—III).

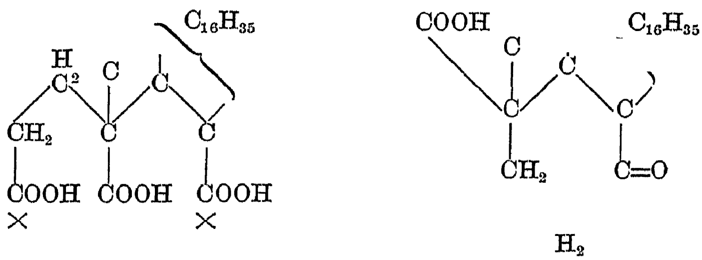


II III

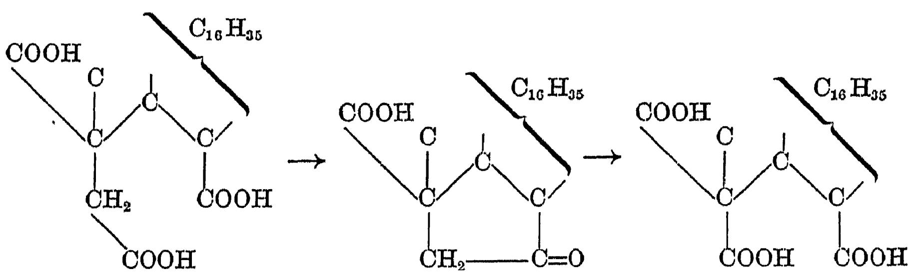
Diese Säure wird bei weiterer Oxydation unter Abspaltung von 2 Molekülen Kohlendioxyd zu einer Tricarbonsäure $C_{25}H_{42}O_6$ abgebaut[92]). Bei der Destillation mit Essigsäureanhydrid geht diese Säure

[92]) Windaus, B. 41, 614 (1908).

unter Verlust von Kohlendioxyd und Wasser an den Stellen ×× in eine Ketocarbonsäure $C_{24}H_{40}O_3$ über.



Die neue Ketocarbonsäure wird durch Oxydationsmittel zu einer Tricarbonsäure $C_{24}H_{40}O_6$ aufgespalten[93]), die bei der Brenzreaktion Kohlendioxyd und Wasser abspaltet. Als Reaktionsprodukt entsteht eine Ketocarbonsäure $C_{23}H_{38}O_3$[94]).

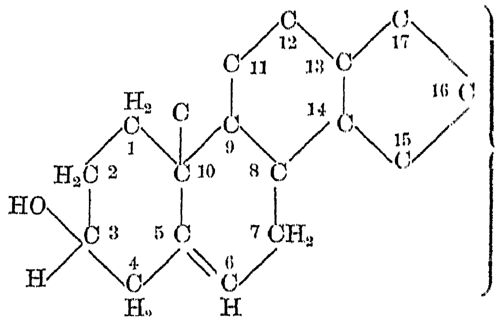


Diese Säure wandelt sich bei der Behandlung mit Salpetersäure in eine Tricarbonsäure $C_{23}H_{38}O_6$ um, die sehr leicht Kohlendioxyd verliert und in eine Säure $C_{22}H_{38}O_4$ übergeht. Sie verhält sich also, entsprechend der Formulierung, wie eine Malonsäure. Die Säure mit den 22 C-Atomen enthält ihre beiden Carboxylgruppen in 1,5-Stellung. Bei der Brenzreaktion kann sie kein cyclisches Keton mehr bilden. Tatsächlich erhält man bei der Destillation der Säure unter den Bedingungen der Blanc'schen Reaktion nur das Säureanhydrid mit der gleichen Anzahl von C-Atomen.

[93]) Windaus, B. 45, 1319 (1912).

[94]) Windaus, Rosenbach und Riemann, H. 130, 120 u. f. (1923).

Dihydrodielssäure. $C_{27}H_{46}O_4$. Darst. durch Hydrierung der Dielssäure mit Platin und Wasserstoff oder durch Clemmensenreduktion der Oxodielssäure $C_{27}H_{42}O_5$, B. 45, 1317 (1912). Aus Eisessig glänzende Blättchen vom Schmp. 252°. Dimethylester aus Methanol lange, dünne Prismen vom Schmp. 123/24°. Windaus, B. 52, 176 (1919).



In der vorstehenden vorläufigen Formel des Cholesterins[95]) ist die Bezifferung der einzelnen C-Atome, wie sie in dem Skelett gebräuchlich ist, angegeben. Damit ist es möglich, die bis jetzt besprochenen Verbindungen eindeutig zu bezeichnen und vor allem die zum Teil falschen historischen Bezeichnungen durch die systematischen Namen zu ersetzen. Das Cholesterin würde danach als ein 3-Oxycholesten-5 zu bezeichnen sein. Allocholesterin = 3-Oxycholesten-4. Cholestenon = 3-Oxocholesten-4. Cholesten = Cholesten-5. Pseudocholesten = Cholesten-4. Heterocholestanon = 6-Oxocholestan. Oxocholestan = 7-Oxocholestan usw. Soweit kann man den Aufbau des Cholesterins aus den Versuchen am Cholesterin selbst bestimmen. Zur Lösung der noch offenen Fragen bedarf man der Untersuchungen an den Gallensäuren. Zu diesem Zweck müssen zunächst die Zusammenhänge zwischen Cholesterin und den Gallensäuren dargelegt werden. Der Stoff, der die Brücke zwischen diesen Substanzen schlägt, ist das Koprosterin. Seine Beziehung zum Cholesterin soll im folgenden besprochen werden.

A II e. Das Koprosterin

Das Koprosterin findet sich im menschlichen Kot und in dem der Carnivoren. Der Gehalt der Faeces an Koprosterin ist sehr stark von der Kost abhängig. Bei reiner Milchdiät geht der Gehalt auf kleine Beträge zurück, während man durch Verfütterung cholesterinreicher Nahrung (Gehirn) eine starke Vermehrung der Ausscheidung erzielen kann[96]). Zur Isolierung wird der getrocknete und gepulverte Kot mit

[95]) In den weiter unten angegebenen Formelbildern sind die Kohlenstoffringe teilweise nur durch Sechs- oder Fünfecke dargestellt. Hierunter sind stets völlig hydrierte Ringe zu verstehen.

[96]) Bondzynski, B. 29, 476 (1896). Bondzynski und Humnicki, H. 22, 396 (1896). Müller, H. 29, 129 (1900). Dorée und Gardner, Proc. roy. Soc. 80, 227 (1908). Fraser und Gardner, Proc. roy. Soc. 81, 230 und 505 (1909). Fischer, H. 73, 232 (1911).

Äther extrahiert. Der Rückstand der ätherischen Lösung wird mit alkoholischem Alkali verseift und danach das Koprosterin aus der alkalischen Lösung mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Abdampfen des Äthers bleibt ein Öl zurück, das bald zu langen Nadeln erstarrt.

Koprosterin ist in Wasser unlöslich. In Chloroform, Äther, Benzol, Aceton, abs. Alkohol und 96proz. Alkohol leicht löslich. 100 ccm abs. Methylalkohol lösen bei 25° 0,7 g Koprosterin. Aus 85proz. Alkohol oder Aceton erhält man es in langen Nadeln vom Schm. 101—02°, die kein Kristallwasser enthalten. Die verschiedenen Angaben in der Literatur über einen höheren oder niedrigeren Schmp. für das Koprosterin aus Faeces lassen sich durch die Anwesenheit mehr oder minder großer Mengen von Cholestanol erklären. Auf die gleiche Ursache ist auch der geringe Gewichtsverlust zurückzuführen, den manche Koprosterinpräparate beim Trocknen bei 100° zeigen. Sie enthalten kleine Mengen des kristallwasserhaltigen Cholestanols. Das Koprosterin ist optisch aktiv. $[\alpha]_D = +23{,}5°$ in Chloroform. Es addiert kein Brom, enthält also keine Doppelbindung wie das Cholesterin. Mit Digitonin liefert es eine schwer lösliche Anlagerungsverbindung, die jedoch leichter löslich als die des Cholesterins ist. Bei der Liebermann-Burchard'schen Farbreaktion tritt Blaufärbung auf, die bald in Grünfärbung übergeht. Die Färbung ist aber sehr viel schwächer als die des Cholesterins[97]).

Koprosterin hat die Zusammensetzung $C_{27}H_{48}O$, enthält also zwei H-Atome mehr als Cholesterin[98]). Das Sauerstoff-Atom hat die Funktion einer Hydroxylgruppe, und zwar ist diese sekundär gebunden und steht in einem Ring. Durch Umsetzung mit Säuren oder Säureanhydriden kann man das Koprosterin in die entsprechenden Ester verwandeln[99]). Durch Einwirkung von Phosphorpentachlorid entsteht ein Koprosterylchlorid, das sein Chlor-Atom bei der Behandlung mit Natrium und Amylalkohol gegen Wasserstoff austauscht. Hierbei gewinnt man den dem Koprosterin entsprechenden Kohlenwasserstoff, der mit dem Cholestan isomer ist, aber von diesem sich durch seine Konstanten deutlich unterscheidet[100]). Durch vorsichtige Oxydation mit Chrom-

97) Windaus, B. 42, 242 (1909). Schönheimer und Dam, H. 215, 59 (1933). s. 96).

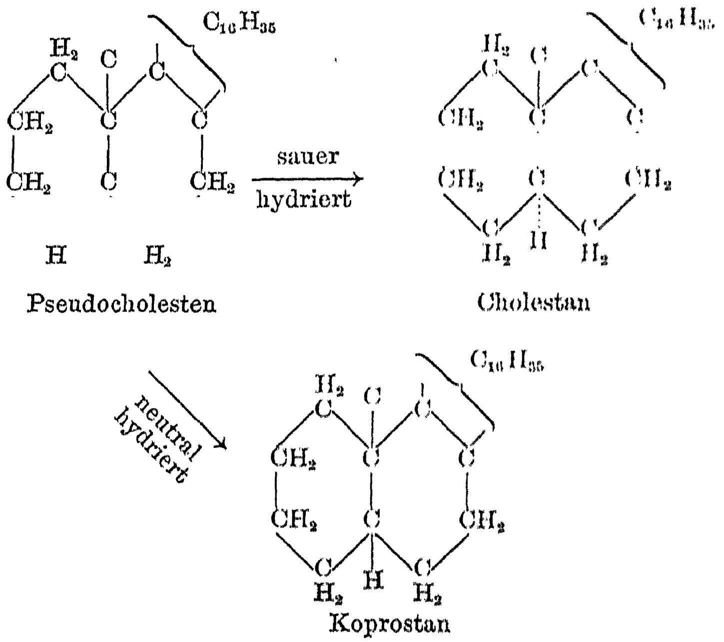
98) H. Fischer, s. 96).

99) Koprosterylacetat. Nadeln vom Schmp. 89/90°. Koprosterylpropionat. Nadeln vom Schmp. 99/100°. Koprosterylbenzoat. Tafeln vom Schmp. 122°. Bondzynski und Humnicki, s. 96). Dorée und Gardner, s. 96). Windaus, B. 49, 1736 (1916).

100) Koprostan. $C_{27}H_{48}$. Aus Äther-Methanol lange Nadeln vom Schmp. 69/70°. $[\alpha]_D = +25{,}07°$ in Chloroform. Windaus und Uibrig, B. 48,

säure läßt sich Koprosterin zu einem Keton $C_{27}H_{46}O$ dehydrieren[101], das durch weitere Oxydation in eine Dicarbonsäure $C_{27}H_{46}O_4$ übergeht[102].

Das Koprostan ist ein Stereoisomeres des Cholestans. Es muß aber strukturell mit ihm übereinstimmen: aus dem Pseudocholesten (Cholesten-4) kann man durch Hydrierung in saurer Lösung das Cholestan erhalten[103]. Führt man aber die Hydrierung in neutraler Lösung durch, so erhält man einen isomeren Kohlenwasserstoff, den Mauthner Pseudocholestan genannt hat[100].



859 (1915). Identisch mit Pseudocholestan. Mauthner, Mh. f. Ch. 30, 639 (1909).

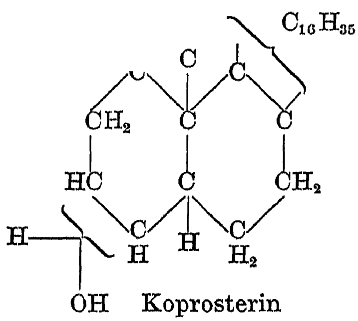
[101]) Koprostanon. $C_{27}H_{46}O$. Dorée und Gardner, Soc. 93, 1628 (1908). Aus Aceton-Alkohol glänzende Blättchen vom Schmp. 62/63°. Semicarbazon Schmp. 187/92°. Oxim-Schmp. 69/71°. Darst. durch Oxydation von Epikoprosterin. Dorée und Gardner, Soc. 93, 1632 (1908). Darst. durch Hydrierung von Cholestenon. Graßhof, H. 223, 250 (1934). Ruzicka, Helv. Ch. A. 17, 1414 (1934).

[102]) Dicarbonsäure aus Koprosterin $C_{27}H_{46}O_4$. Darst. durch Oxydation von Koprosterin oder Epikoprosterin mit Chromsäure. In kaltem Benzol unlöslich. Aus Essigsäure lange Prismen vom Schmp. 249°. Dimethylester aus Methanol lange Nadeln vom Schmp. 61°. Gardner und Godde, Biochem. J. 7, 590 (1913). Windaus, B. 49, 1724 (1916).

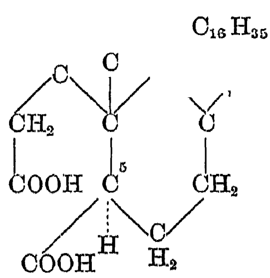
[103]) Windaus, B. 52, 174 (1919).

Dieses Pseudocholestan erwies sich nun als identisch mit dem Grundkohlenwasserstoff des Koprosterins, dem Koprostan.

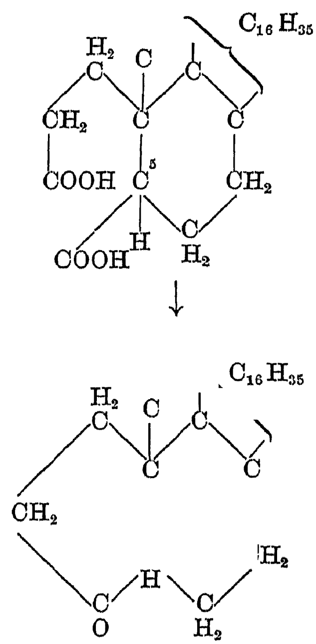
Die Hydrierung des Pseudocholestens führt je nach den Bedingungen der Hydrierung zu einer cis- oder trans-Anlagerung des Wasserstoffs und läßt so zwei Isomere entstehen, die sich wie cis- und trans-Dekalin zueinander verhalten. Wie weiter unten gezeigt wird, ist das Koprostan das Derivat des cis-Dekalins, das Cholestan das Derivat des trans-Dekalins. Noch auf einem anderen Wege läßt sich die strukturelle Übereinstimmung des Skeletts des Cholestans und Koprostans zeigen. Die Dicarbonsäure aus Koprosterin ist nach ihren Eigenschaften sicher verschieden von der oben beschriebenen Dihydro-diels-säure. Unterwirft man aber beide Dicarbonsäuren der Blancschen Reaktion (Destillation mit Essigsäureanhydrid), so gehen sie in das gleiche Keton von der Zusammensetzung $C_{26}H_{44}O$ über[104]). Die beiden Dicarbonsäuren sind da-



Koprosterin



Dihydro-diels-säure

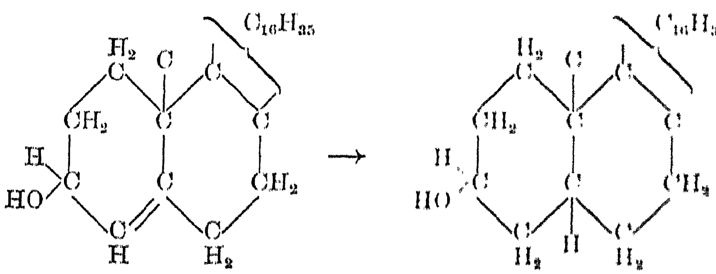


Brenzketon $C_{26}H_{44}O$

nach strukturell gleich. Sie unterscheiden sich durch die verschiedene sterische Anordnung der Substituenten am C-atom 5, was bei der Dihydro-

[104]) Keton $C_{26}H_{44}O$. Darst. durch Destillation der Dicarbonsäure aus Koprosterin oder der Dihydrodielssäure oder durch Hydrierung des ungesättigten Brenzketons der Dielssäure. Aus Methanol Nadelbüsche vom Schmp. 73/74°. W i n d a u s, B. 52, 175 (1919).

diels-säure wie oben beim Cholestan durch Punktieren der Wasserstoff-bindung an C_5 angedeutet wurde (vgl. S. 85). Bei der Cyclisierung lagert sich der Fünfring in einer räumlich bevorzugten Form an den Ring B an. Eine der beiden Säuren lagert sich hierbei in die andere um, so daß wir so zu einem strukturell und sterisch gleichen Derivat gelangen. Damit ist zugleich die Konstitution der Dicarbonsäure aus Koprosterin festgestellt. Für das Koprosterin bleibt aber noch die Frage nach der Lage der Hydroxylgruppe offen. Sie könnte nach der Konstitution der Dicarbonsäure an C_3 oder C_4 stehen. Bei der Hydrierung des Allocholesterins erhält man neben Cholestanol auch Koprosterin[105]). Damit ergibt sich, daß Koprosterin seine Hydroxylgruppe an C_3 trägt. Die Ausbeute an Koprosterin wird aber bei dieser Umwandlung dadurch stark beeinträchtigt, daß Allo-cholesterin sich bei der Berührung mit dem Platinkatalysator in Cholesterin zurückverwandelt, das bei der Hydrierung nur Cholestanol liefert.



Allo-cholesterin → Koprosterin

Der Weg, den Windaus zuerst zur Darstellung des Koprosterins eingeschlagen hat, ist folgender[106]): Cholesterin wird bei 200° mit Nickel und Wasserstoff hydriert. Dabei entstehen vier Reaktionsprodukte von der Formel $C_{27}H_{48}O$. Außer den schon bekannten Stoffen Cholestanol und Koprosterin bilden sich die Derivate, in denen die Hydroxylgruppe an C_3 die entgegengesetzte räumliche Lage hat wie im Cholestanol und Koprosterin. Diese Stoffe nennen wir Epi-cholestanol[107]) und Epi-koprosterin. Die Richtigkeit der Annahme, daß die beiden Stoffe an C_3 stereoisomer sind, ergibt sich aus dem Übergang des Epi-cholestanols bei der Oxydation mit Chromsäure in Cholestanon[107]), also das gleiche Keton,

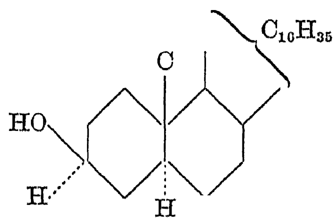
---

[105]) Windaus, A. 453, 110 (1927).

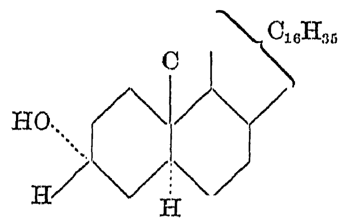
[106]) Windaus, B. 49, 1724 (1916).

[107]) Epicholestanol $C_{27}H_{48}O$ (früher ε-Cholestanol). Darst. durch Erhitzen von Cholestanol mit Natriumamylat oder Natrium in Xylol. Win-

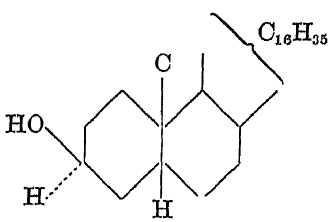
das aus Cholestanol selbst entsteht. Entsprechend liefert Epi-koprosterin bei der Oxydation Koprostanon[108]). Cholestanol und Epi-cholestanol lassen sich durch Erhitzen mit metallischem Natrium in Xylol oder mit Natriumäthylat-Lösung bei 180° wechselseitig ineinander überführen. Es stellt sich ein Gleichgewicht ein, das bei ca. 90 Prozent Cholestanol liegt. Ganz analog kann man Koprosterin und Epi-koprosterin ineinander verwandeln. Das Gleichgewicht liegt hier weit zur Seite des Epi-Derivats. Es bilden sich ca. 90 Prozent Epikoprosterin neben 10 Prozent Koprosterin.



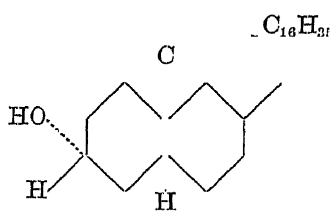
Cholestanol



Epi-cholestanol



Koprosterin



Epi-koprosterin

Die Epiderivate unterscheiden sich in charakteristischer Weise von ihren Muttersubstanzen. Sie geben nicht mehr wie Cholestanol und Koprosterin mit Digitonin schwer lösliche Anlagerungsverbindungen.

daus und Uibrig, B. 47, 2387 (1914). Darst. durch Hydrierung von Cholestanon mit Platin und Wasserstoff. Vavon und Jakubowicz, Bl. [4] 53, 584 (1933). Ruzicka, Helv. Ch. A. 17, 1411 (1934). Aus Alkohol derbe Nadeln vom Schmp. 186/87°. $[\alpha]_D = + 33{,}95°$. Fällt nicht mit Digitonin. Geht bei der Oxydation mit Chromsäure in Cholestanon über. Acetat Schmp. 95/96°.

[108]) Epikoprosterin. $C_{27}H_{48}O$ (δ-Cholestanol, Pseudokoprosterin). Darst. durch Erhitzen von Koprosterin mit Natriumamylat oder aethylat. Dorée und Gardner, Soc. 93, 1630 (1908). Windaus und Uibrig, B. 48, 860 (1915), Windaus, B. 49, 1731 (1916). Darst. durch Hydrierung von Koprostanon mit Platin und Wasserstoff in neutraler Lösung. Ruzicka c. s., Helv. Ch. A. 17, 1414 (1934). Aus Alkohol lange, derbe Nadeln vom Schmp. 116/18°. $[\alpha]_D = + 31{,}62°$ in Chloroform. Fällt nicht mit Digitonin. Acetat kurze, derbe Kristalle vom Schmp. 83/84°.

Hierauf gründet sich das Verfahren, nach dem Windaus zuerst das Koprosterin aus dem Gemisch der vier Produkte, die bei der Hydrierung des Cholesterins bei 200° entstehen, herausgearbeitet hat. Das Reaktionsprodukt enthält in der Hauptsache Cholestanol und Epi-koprosterin. Man fällt aus der alkoholischen Lösung mit Digitonin das Cholestanol und das in geringerer Menge vorhandene Koprosterin heraus, während Epi-koprosterin und Epi-cholestanol in Lösung bleiben. Sie werden isoliert und dann mit Natriumaethylat erhitzt. Hierbei lagert sich das Epicholestanol zu 90 Prozent in Cholestanol um, das Epi-koprosterin zu 10 Prozent in Koprosterin. Unterwirft man nun das Reaktionsprodukt einer erneuten Digitoninfällung, so erhält man einen nicht fällbaren Anteil, der weitgehend an Epikoprosterin angereichert ist. Aus diesem läßt sich durch erneute Aethylatumlagerung in 10 Prozent Ausbeute Koprosterin darstellen.

Vom Cholesterin und Cholesten aus ist es nie geglückt, die katalytische Hydrierung mit Platin bei niedrigen Temperaturen so zu leiten, daß sich die Derivate des Koprosterins bilden. Es gelingt merkwürdigerweise nur mit den Stoffen, die die Doppelbindung in der 4,5-Stellung haben. Das Allo-cholesterin stellt, da es sich sehr leicht wieder in Cholesterin zurückverwandelt, ein ungeeignetes Ausgangsmaterial zur Hydrierung zum Koprosterin dar. Dagegen hat man in letzter Zeit in dem Cholestenon, dem 3-Oxo-cholesten-4, den Stoff gefunden, der den Übergang in die Koprosterinreihe leicht und quantitativ gestattet. Man kann, wie Arbeiten von Grasshof und von Ruzicka gezeigt haben, das Cholestenon durch Hydrierung mit Palladium in neutraler Lösung nahezu quantitativ in Koprostanon verwandeln[101]). Das Koprostanon kann wieder je nach der Hydrierung in saurer oder neutraler Lösung in Koprosterin[109]) oder Epikoprosterin[108]) übergeführt werden.

A II f. Cholsäure und Cholansäure

Die Cholsäure. Die Cholsäure stellt den Hauptbestandteil der Gallensäurenfraktionen der Rinder- oder Menschengalle dar. Sie liegt in den Gallen gepaart mit Taurin oder Glykokoll als Natriumsalz vor und läßt sich durch Verseifung aus diesen Verbindungen in freier Form erhalten. Aus 1 kg Rindergalle lassen sich etwa 50 bis 60 g Cholsäure darstellen.

Zur Gewinnung der Cholsäure verseift man Rindergalle, die evtl. durch Behandlung mit Alkohol schleimfrei gemacht ist, durch Kochen mit Alkali. Nach dem Ansäuern mit Salzsäure fallen die Gallensäuren zusammen mit

[109]) Ruzicka, Helv. Ch. A. 17, 1415 (1934).

dem Gallenfarbstoff (Biliverdin) aus. Man läßt die ausgefällte Masse durch 24stündiges Stehen hart werden, knetet sie mit Wasser durch und filtriert sie ab. Sie wird gut getrocknet und dann mit Alkohol stehen gelassen. Es scheidet sich ein Kristallbrei aus, der im wesentlichen aus der Alkoholverbindung der Cholsäure besteht. Die Kristalle werden abgesaugt und mit wenig abs. Alkohol ausgewaschen. Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Alkohol gewinnt man die Cholsäure in reiner Form[110]).

Die Cholsäure bildet aus Alkohol kristallisiert tetraedrische Kristalle mit einem Molekül Kristallalkohol. Aus verdünnter Essigsäure kristallisiert sie mit einem Molekül Kristallwasser. Durch Erhitzen auf 130° wird der Kristall-alkohol oder das Kristallwasser leicht abgegeben. Schmp. der Cholsäure 196/98°. Sie ist optisch aktiv, in alkoholischer Lösung ist $[\alpha]_D = +31{,}55°$. Die kristallwasser- und alkoholfreie Säure zeigt $[\alpha]_D = +37{,}02°$. Sie ist in 4000 Teilen kaltem und 750 Teilen heißem Wasser löslich. Sie löst sich in ca. 20 Teilen Alkohol, in 27 Teilen Äther. Leicht löslich in Eisessig. Die Alkalisalze der Cholsäure sind in Wasser leicht löslich, weniger in Alkohol. Das Bariumsalz löst sich in Alkohol, in 30 Teilen Wasser. Die Blei und Silbersalze sind in Wasser fast unlöslich. Die Cholsäure schmeckt süßlich-bitter[111]).

Zum Nachweis der Cholsäure lassen sich folgende Farbreaktionen verwenden:

a) Jod-Reaktion nach Mylius[112]): 0,02 g Cholsäure werden in 0,5 g Alkohol gelöst und mit 1 ccm n/10-Jod-Lösung versetzt. Beim vorsichtigen Verdünnen mit Wasser erstarrt die Flüssigkeit zu einem Kristallbrei von Nadeln, die im durchfallenden Licht blaue Färbung zeigen.

b) Reaktion nach Hammarsten[113]): Pulverisierte Cholsäure wird in 25proz. Salzsäure eingetragen. Es tritt zunächst Violettfärbung auf, die in Grün und Gelb übergeht.

c) Fluorescenzreaktion[114]): In konzentrierter Schwefelsäure löst sich Cholsäure zu einer rotgelben Flüssigkeit, die grüne Fluorescenz zeigt.

d) Reaktion nach Pettenkofer[115]): Eine wäßrige Lösung von

[110]) Strecker, A. 67, 1 (1848). Mylius, H. 12, 262 (1888). Lassar-Cohn, H. 19, 563 (1893). Vahlen, H. 21, 253 (1896). Pregl, Mh. f. Ch. 24, 19 (1903). H. 74, 198 (1911). Langheld, B. 41, 378 (1908). Wieland und Weil, H. 80, 287 (1912). Hammarsten, Handb. d. biol. Arbeitsmeth. (Abderhalden), Abt. I, Teil 6, 227 (1922). Gattermann-Wieland, Praxis des org. Chemikers, 23. Aufl., 397 (1933).

[111]) s. Fußnote 110. Ekbom, H. 50, 101 (1906). Hammarsten, H. 36, 540 (1902).

[112]) Mylius, H. 11, 306 (1887). B. 28, 385 (1895).

[113]) Hammarsten, H. 61, 495 (1909).

[114]) Hoppe-Seyler-Thierfelder, Physiol. u. Pathol. Chem. Analyse, 9. Aufl., 336 (1924). Pregl, H. 45, 166 (1905).

[115]) Hoppe-Seyler-Thierfelder, 337.

Cholsäure wird mit wenig 10proz. Rohrzuckerlösung gemischt und tropfenweise mit konzentrierter Schwefelsäure unter Umschütteln versetzt. Es tritt eine kirschrote Färbung auf, die bald in Purpurrot und bei langem Stehen der Lösung in Blaurot übergeht. Nach Udranszky kann man anstelle von Rohrzuckerlösung auch Furfurol benutzen[116]).

Die Cholsäure $C_{24}H_{40}O_5$ ist eine Trioxy-monocarbonsäure. Die Zusammensetzung der Cholsäure wurde zuerst von Strecker[117]) zu $C_{24}H_{40}O_5$ richtig bestimmt und später von Mylius[118]) bestätigt. Die Funktionen der Sauerstoffatome in der Cholsäure lassen sich leicht bestimmen. Sie ist, wie aus der Zusammensetzung der oben erwähnten Salze hervorgeht, eine Monocarbonsäure und bildet entsprechend einen Monomethyl- oder Monoaethylester[119]). Die drei übrigen Sauerstoffatome liegen als Hydroxyle vor. Durch Behandlung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin geht der Cholsäuremethylester in ein Triacetylderivat über[120]). Durch vorsichtige Oxydation mit Chromsäure lassen sich die Hydroxyle dehydrieren, man erhält die sog. Dehydrocholsäure $C_{24}H_{34}O_5$[121]). Die Dehydro-cholsäure gibt keine Aldehydreaktionen. Ihr Trioxim bildet bei der Behandlung mit Essigsäureanhydrid ein Trioxim-triacetat[122]). Ein Oxim eines Aldehyds würde hierbei ein Nitril liefern. Man kann hieraus den Schluß ziehen, daß die drei Hydroxyle der Cholsäure sekundär sind und bei der Bildung der Dehydrocholsäure in Ketogruppen übergegangen sind. Die Richtigkeit dieser Annahme wird weiter unten durch den Übergang von Cholsäureabkömmlingen in Polycarbonsäuren bewiesen. Wieland und Weyl[123])

[116]) Udranszky, H. 12, 370 (1888).

[117]) Strecker, A. 67, 1 (1848).

[118]) Mylius, B. 20, 1968 (1887).

[119]) Cholsäuremethylester. Darst. durch Erwärmen von Cholsäure mit methylalkoholischer Salzsäure. Aus Methanol Nadeln vom Schmp. 147°. Hoppe-Seyler, J. pr. Ch. 89, 272 (1863). Schotten, H. 10, 175 (1886). S. a. Uraki, H. 207, 20 (1932).

Cholsäureäthylester. Darst. durch Einwirkung von alkoholischer Salzsäure auf Cholsäure. Aus Alkohol oder Essigester Nadeln vom Schmp. 162°. Bondi und Müller, H. 47, 502 (1906).

[120]) Wieland und Kapitel, H. 212, 271 (1933).

[121]) Dehydrocholsäure $C_{24}H_{34}O_5$. Aus verdünntem Eisessig Nadeln vom Schmp. 239°. Methylester: aus Methanol Nadeln vom Schmp. 241/42°. Trioxim des Methylesters: aus Methanol Blättchen, Schmp. 265°. Hammarsten, B. 14, 71 (1881).

[122]) Schenck, H. 87, 71 (1913). Borsche, B. 52, 1353 (1919).

[123]) H. 80, 287 (1912). Cholatriensäure: Aus Alkohol Tafeln, die bei 140° sintern und bei 163/64° schmelzen. $[\alpha]_D = -19,7°$ (Chloroform). Methylester: aus Methanol Nadeln vom Schmp. 50/51°. Die Säure gibt bei der

konnten aus der Cholsäure durch Erhitzen im Vakuum drei Mol Wasser abspalten und so zu einer dreifach ungesättigten Monocarbonsäure $C_{24}H_{34}O_2$, der Cholatriensäure, gelangen. Diese nimmt bei der katalytischen Hydrierung drei Mol Wasserstoff auf und bildet eine gesättigte Carbonsäure $C_{24}H_{40}O_2$, die Cholansäure, die theoretisch außerordentlich wichtige Stammsubstanz der Gallensäuren. Dieselbe Säure gewinnt man auch durch Reduktion der Dehydrocholsäure nach der Methode von Clemmensen[124]). Die Cholsäure ist also eine Trioxy-cholansäure.

A II g. Die Beziehungen zwischen Koprostan und der Cholansäure

Die Cholansäure $C_{24}H_{40}O_2$ weist gegenüber einer gesättigten Paraffincarbonsäure mit der gleichen Zahl von C-Atomen $C_{24}H_{48}O_2$ ein Defizit von 8 Wasserstoffatomen auf. Sie enthält also ebenso wie das Cholesterin vier Kohlenstoffringe. Nach dem gemeinsamen Vorkommen und auch nach einigen ähnlichen Farbreaktionen ist schon früh die Ansicht geäußert worden, daß dieses Vierringskelett der Cholsäure mit dem des Cholesterins identisch sei[125]). Den sicheren Beweis hierfür hat Windaus[126]) im Jahre 1919 geliefert. Auf die richtige Spur wurde er durch die Beobachtung geführt, daß Cholesterin und Cholesterinderivate bei der Oxydation mit Chromsäure stets Aceton lieferten, während die Cholsäure oder die Cholansäure unter den gleichen Bedingungen keine Spur Aceton ergaben[127]). Es lag nun nahe anzunehmen, daß die drei C-Atome, die das Cholesterin mehr besitzt als die Cholansäure, in Form einer Isopropyl-Gruppe vorliegen (s. oben Seitenkette des Cholesterins), die der Cholansäure fehlt. Wenn es gelingen würde, die Isopropylgruppe aus dem Cholesterin zu entfernen, ohne den übrigen Teil des Moleküls anzugreifen, müßte man zu einem Stoff mit dem Grundskelett der Cholansäure kommen. Als geeignetes Ausgangsmaterial zur Prüfung dieser Annahme

Liebermann-Burchardschen Reaktion eine Gelbfärbung, die über violett in blau und grün übergeht.

[124]) Cholansäure $C_{24}H_{40}O_2$. Aus Alkohol Spieße vom Schmp. 164°. Äthylester: aus Alkohol Nadeln vom Schmp. 93/94°. Wieland, H. 80, 287 (1912), 106, 190 (1919). Borsche, B. 52, 1364 (1919).

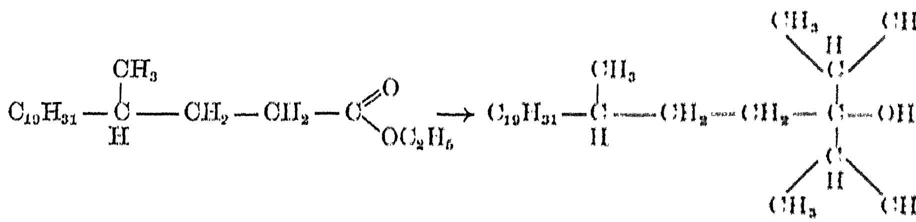
[125]) Windaus, Archiv d. Pharm. 246, 147 (1908), Lifschütz, B. 47, 1459 (1914).

[126]) Windaus, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen. Math. phys. Kl. 1919, Windaus und Neukirchen, B. 52, 1915 (1919). Allocholansäure. Aus Essigsäure umkristallisiert, Nadeln vom Schmp. 172°. Methylester: aus Methanol Nadeln vom Schmp. 93/94°. Propylester Schmp. 103/04°. S. a. A. 447, 233 (1926). Helv. Ch. A. 18, 656 (1935).

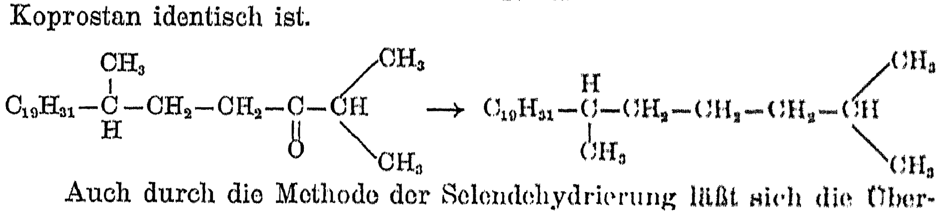
[127]) Windaus, H. 100, 167 (1917).

wurde zunächst das Cholestan verwendet. Tatsächlich gelang es, durch Oxydation mit Chromsäure aus dem Cholestan Aceton abzuspalten und das andere Spaltstück, eine Monocarbonsäure von der Zusammensetzung $C_{24}H_{40}O_2$, zu isolieren. Diese Monocarbonsäure hat also die gleiche Zusammensetzung wie die Cholansäure und ähnelt ihr auch in ihren Eigenschaften. Wie aber der sorgfältige Vergleich ergab, ist die neue Säure nicht mit ihr identisch. Die gleiche Oxydation wurde nun mit dem stereoisomeren Kohlenwasserstoff Koprostan durchgeführt. Die Reaktion verlief ganz analog: es entstand Aceton und eine Monocarbonsäure $C_{24}H_{40}O_2$. Diese Säure aus Koprostan stimmte nun aber in ihren Eigenschaften völlig mit der Cholansäure überein. Damit war der Nachweis erbracht, daß das Kohlenstoffskelett der Cholansäure mit dem des Koprostans und damit auch mit dem des Cholesterins identisch ist.

Auch der umgekehrte Weg, die Synthese des Koprostans aus Cholansäure, ist mit Erfolg beschritten worden. Wieland und Jacobi[128]) setzten Cholansäureaethylester mit Isopropylmagnesiumjodid um und erhielten hierbei einen tertiären Alkohol von der angegebenen Formel:



Durch Oxydation mit Chromsäureanhydrid in Eisessig wird aus dem Carbinol eine Isopropylgruppe abgespalten, das Reaktionsprodukt ist ein Keton $C_{27}H_{46}O$. Durch Reduktion nach Clemmensen läßt sich das Keton in einen Kohlenwasserstoff $C_{27}H_{48}$ verwandeln, der mit dem Koprostan identisch ist.

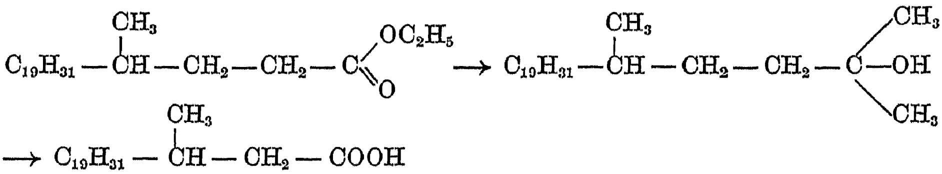


Auch durch die Methode der Selendehydrierung läßt sich die Übereinstimmung der Struktur des Kohlenstoffskeletts des Cholesterins und der Cholsäure nachweisen. Cholsäure, Cholansäure und Cholatriensäure liefern ebenfalls den Kohlenwasserstoff $C_{18}H_{16}$, das γ-Methyl-cyclopenteno-phenanthren[129]). Somit lassen sich die Arbeiten an den Gallensäuren auch zur Bestimmung des Aufbaus des Cholesterins heranziehen.

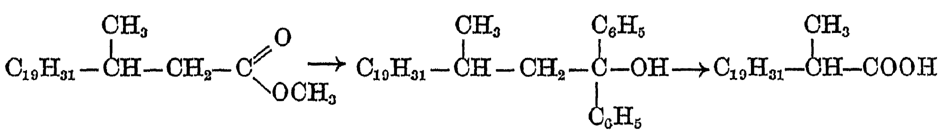
[128]) Wieland und Jacobi, B. 59, 2064 (1926).
[129]) Siehe S. 38.

A II h. Abbau der Cholansäure

Abbau der Cholansäure zur Aetiocholansäure. Wieland, Jacobi und Schlichting[130]) haben die Cholansäure einem systematischen Abbau von der Carboxylgruppe der Seitenkette her unterworfen, um über deren Haftstelle am Ringsystem und den nächstbeteiligten Ring Auskunft zu erhalten. Cholansäureaethylester wurde mit Methylmagnesiumjodid umgesetzt und in ein Dimethylcarbinol verwandelt. Bei der Oxydation mit Chromsäure ließ das Carbinol sich in eine Säure $C_{23}H_{38}O_2$ überführen.



Diese Säure, die den Namen Norcholansäure erhalten hat, ließ sich auf dem analogen Wege wiederum um ein C-Atom verkürzen. Es erwies sich nur als günstiger, das Diphenyl-carbinol zum Abbau zu verwenden. Man kommt so zu einer Säure $C_{22}H_{36}O_2$, zur Bisnor-cholansäure.



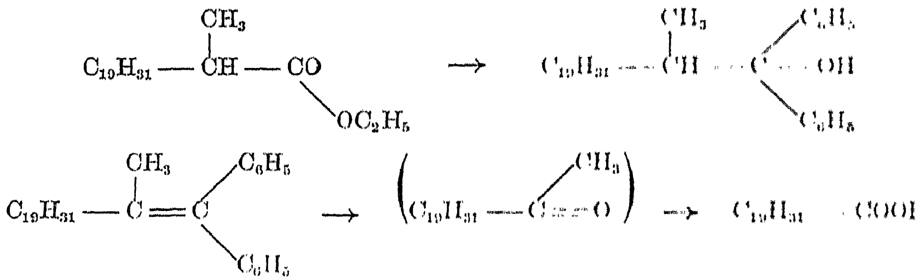
130) Wieland, Schlichting und Jacobi, H. 161, 80 (1926). Norcholansäure. $C_{23}H_{38}O_2$. Darst. durch Oxydation des Dimethylnorcholylcarbinols (Schmp. 96/97°) mit Chromsäure. Aus dem sauren Anteil über das schwer lösliche Natriumsalz isoliert. Aus Eisessig lange Nadeln vom Schmp. 177°. Äthylester: aus Alkohol flache Prismen vom Schmp. 66/67°. Methylester: aus Methanol Nadeln vom Schm. 74°.

α-Bisnorcholansäure. $C_{22}H_{36}O_2$. Darst. durch Chromsäureoxydation des Diphenyl-bisnorcholylcarbinols (Schmp. 122/23°). Aus dem sauren Anteil über das schwer lösliche Natriumsalz abgetrennt. Aus Alkohol oder Eisessig umkristallisiert lange Nadeln oder Prismen. Schmp. 214°. $[\alpha]_D = -7{,}5°$ (in Alkohol). Äthylester aus Alkohol Nadeln vom Schmp. 106/07°. β-, γ-, δ- und ε-Bisnorcholansäure s. Original.

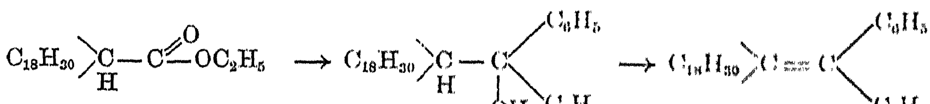
Kohlenwasserstoff $C_{34}H_{44}$. Darst. durch Einwirkung von Phenylmagnesiumbromid auf Bisnorcholansäureäthylester und Kristallisation des primär entstandenen Carbinols aus Eisessig Schmp. 175/76°.

Ätio-cholansäure. $C_{20}H_{32}O_2$. Darst. durch Oxydation des Kohlenwasserstoffs $C_{34}H_{44}$ mit Chromsäure. Aus dem sauren Anteil über das schwer lösliche Natriumsalz isoliert. Aus Eisessig umkristallisiert farblose Nadeln vom Schmp. 219°. Methylester aus Alkohol Nadeln vom Schmp. 98/99°. Äthylester prismatische Nadeln oder Blättchen vom Schmp. 78/79°.

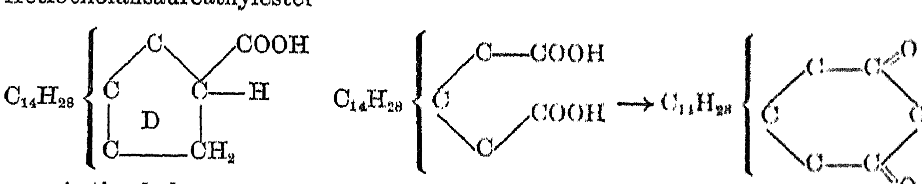
Diese Säure enthält nach den Kenntnissen, die wir vom Aufbau der Seitenkette haben, ihr Carboxyl an einem tertiären C-Atom. In Übereinstimmung damit ist sie sehr viel schwieriger zu verestern als die homologen Säuren. Bei dem Abbau, der in der gleichen Weise weitergeführt wurde, lassen sich zwei C-Atome entfernen, wobei die intermediäre Bildung eines (im Neutralteil gefaßten) Ketons anzunehmen ist. Die entstandene Säure hat die Zusammensetzung $C_{20}H_{32}O_2$. In ihr ist die ganze Seitenkette zu einer Carboxylgruppe abgebaut. Sie trägt die Säuregruppe an dem Rest $C_{19}H_{31}$, der das für die Cholansäure charakteristische Vierring-Skelett enthält, und hat den Namen Aetio-cholansäure erhalten.



D i e S e i t e n k e t t e h a f t e t a m R i n g D. Der zur Aetio-cholansäure durchgeführte Abbau brachte den exakten Beweis für die Richtigkeit der bisher über den Aufbau der Seitenkette gewonnenen Kenntnisse. Es gelang W i e l a n d, durch den weiteren Abbau der Aetio-cholansäure den Nachweis zu erbringen, daß die Seitenkette sich unmittelbar an einem Kohlenstoffring befindet und daß dieser Ring sich wie ein Fünfring verhält. Aetio-cholansäure-aethylester wurde mit Phenylmagnesiumbromid umgesetzt. Bei der Zersetzung der Grignard-Verbindung spaltet das primär gebildete Carbinol Wasser ab. Man isoliert als Reaktionsprodukt einen Kohlenwasserstoff $C_{32}H_{40}$. Bei der Chromsäureoxydation erhält man hieraus eine Dicarbonsäure $C_{19}H_{30}O_4$, die den Namen Aetio-biliansäure bekommen hat.



Aetiocholansäureäthylester



Aetio-cholansäure Aetio-biliansäure

Daraus ergibt sich, daß die Seitenkette an einem tertiären C-Atom haftet, das in einem Ring liegt, und daß neben diesem C-Atom noch eine CH_2-Gruppe vorhanden ist. Über die Gliederzahl des aufgespaltenen Ringes gibt die thermische Zersetzung der Aetio-biliansäure Auskunft. Sie führt zu dem Anhydrid der Aetiobiliansäure, $C_{19}H_{28}O_3$. Bei Gültigkeit der Blancschen Regel sollte dieser Ring ein Fünfring sein. Im Vierringskelett ist nur ein Fünfring vorhanden, der Ring D. An diesem muß also die Seitenkette C_8H_{17} des Cholesterins und C_4H_8COOH der Cholansäure haften.

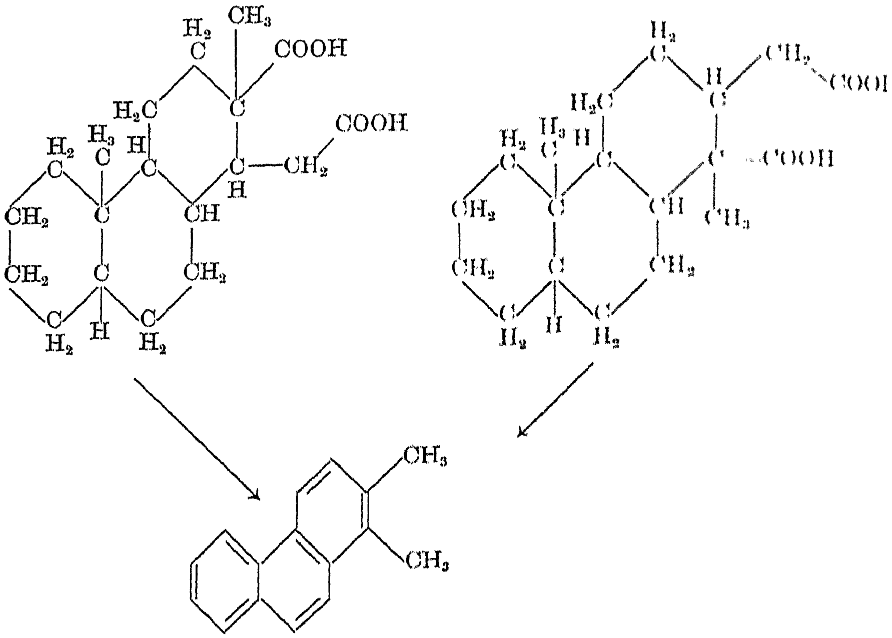
Wieland, Schlichting und Jacobi, H. 161, 104 (1926). Ätiobiliansäure $C_{19}H_{30}O_4$. Darst. durch Chromsäureoxydation des Kohlenwasserstoffs $C_{32}H_{40}$ (aus Bisnorcholansäureäthylester und Phenylmagnesiumbromid, Schmp. 233°). Die Ätiobiliansäure bildet aus Eisessig umkristallisiert gedrungene Prismen vom Schmp. 228°. Durch Erhitzen von Ätiobiliansäure auf 230° entsteht ihr Anhydrid $C_{19}H_{23}O_2$, das im Hochvakuum in langen Nadeln vom Schmp. 206° sublimiert.

Selendehydrierung der Aetiobiliansäure. Butenandt und Mitarbeiter[131]) haben die Aetiobiliansäure mit Selen dehydriert und erhielten hierbei einen Kohlenwasserstoff $C_{16}H_{14}$, der durch Vergleich mit einem synthetischen Produkt als 1,2-Dimethyl-phenanthren identifiziert werden konnte. Aus diesem Befund ergeben sich einige wichtige Schlußfolgerungen:

a) Die Aetiobiliansäure $C_{19}H_{30}O_4$ gibt bei der Selendehydrierung drei Kohlenstoffatome ab, davon zwei aus den Carboxylgruppen als Kohlendioxyd. Das dritte wird in anderer Form, wahrscheinlich als Methan, abgespalten. Dieses Kohlenstoffatom kann nur das sein, das nach der geringen Veresterungsgeschwindigkeit der Säure $C_{22}H_{42}O_2$ aus Cholestenon am C-Atom 10 angenommen worden ist. Am Kohlenstoffatom 10 haftet also eine Methylgruppe.

b) Das noch fehlende Kohlenstoffatom muß quartär gebunden an der Verknüpfungsstelle von Ring C und D stehen. Für die Aetiobiliansäure ergeben sich damit noch zwei Möglichkeiten der Formulierung, um zusammen mit den bisherigen Ergebnissen den Übergang in 1,2-Dimethylphenanthren zu erklären:

[131]) Butenandt, Weidlich und Thompson, B. 66, 601 (1933). Kohlenwasserstoff $C_{16}H_{14}$: Darst. durch Selendehydrierung der Ätiobiliansäure. Das Pikrat vom Schmp. 148° zeigt keine Depression mit dem Pikrat des 1,2-Dimethylphenanthrens. Kristallographischer Vergleich. 1,2-Dimethylphenanthren: Schmp. 140°.



Die Methylgruppe muß sich in Nachbarschaft zu dem Kohlenstoffatom befinden, an dem die Seitenkette an den Ring D angeschlossen ist. Die folgenden Untersuchungen an verschiedenen Gallensäuren, die zugleich die Stellung der Hydroxyle in der Cholsäure festzulegen gestatten, bringen auch die Lösung dieser Frage.

A II i. Desoxycholsäure und Lithocholsäure

Die Desoxycholsäure. Aus der Rindergalle konnten nach Abtrennung der Cholsäure zwei weitere Gallensäuren isoliert werden, denen beiden nach der Analyse die Formel $C_{24}H_{40}O_4$ zuerteilt wurde. Die erste Säure wurde von Latschinoff[132]) im Jahre 1885 entdeckt. Er nannte sie Choleinsäure. Ein Jahr später berichtete Mylius[133]) über eine zweite Säure von der gleichen Zusammensetzung, die er aus verfaulter Rindergalle isoliert hatte. Er nahm an, daß bei dem Fäulnisprozeß ein Hydroxyl aus der Cholsäure entfernt worden sei und nannte die Säure danach Desoxycholsäure. Diese Annahme einer Umwandlung von Cholsäure in Desoxycholsäure erwies sich aber später durch Untersuchungen

[132]) Latschinoff, B. 18, 3039 (1885); B. 19, 1140 (1886); B. 20, 1043 (1887).

[133]) Mylius, B. 19, 369 (1886); B. 20, 1986 (1887).

von Ekbom[134]) als unrichtig. Die Desoxycholsäure ist ein primärer Bestandteil der Gallenflüssigkeit. Die beiden Säuren, Choleinsäure und Desoxycholsäure, unterscheiden sich durch ihre physikalischen Konstanten weitgehend, so daß kein Zweifel darüber bestehen konnte, daß es sich um zwei chemische Individuen handelt. Wieland und Sorge[135]) gelang es, den Nachweis zu führen, daß die Choleinsäure ein Derivat der Desoxycholsäure ist. Sie ist ein eigenartiges Kombinationsprodukt von acht Molekülen Desoxycholsäure mit einem Molekül Fettsäure. Es gelingt auf verschiedene Weise die Fettsäure aus der Choleinsäure zu entfernen und sie so in Desoxycholsäure überzuführen. Die eigenartige Zusammensetzung der Choleinsäure bedingt es, daß ihre analytische Zusammensetzung sich nahezu mit den Werten für eine Formel $C_{24}H_{40}O_4$ deckt. Über die Eigenschaft der Desoxycholsäure, mit organischen Molekülen die verschiedenartigsten Molekülverbindungen zu bilden, wird weiter unten noch eingehend gesprochen.

Die Darstellung der Desoxycholsäure beruht darauf, daß ihr Bariumsalz (auch das der Choleinsäure) in Alkohol leicht löslich ist. Nach möglichst weitgehender Abtrennung der Cholsäure führt man die restlichen Säuren in ihre Bariumsalze über und zieht diese mit verdünntem Alkohol aus. Der Alkoholextrakt wird zur Trockne eingedampft und die Extraktion mit Alkohol noch einmal wiederholt. Evtl. entfärbt man die Lösung mit Tierkohle, führt die Bariumsalze in die Alkalisalze über und fällt das Gemisch von Desoxycholsäure und Choleinsäure mit Salzsäure aus. Die getrocknete Säure wird mit Eisessig ausgewaschen, um noch vorhandene Cholsäure und Farbstoffe zu entfernen. Dann kristallisiert man sie aus Eisessig um. Hierbei wird die Choleinsäure in ihre Komponenten gespalten. Aus der Eisessiglösung kristallisiert die Desoxycholsäure mit einem Molekül Kristallessigsäure aus.

Die Desoxycholsäure hält alle Lösungsmittel, aus denen sie kristallisiert wird, außerordentlich fest gebunden. Es bedarf langen Erhitzens auf 130° im Hochvakuum, um Lösungsmittel wie Eisessig, Äther, Aceton und Essigester zu entfernen. Leichter gibt sie den Kristall-Alkohol ab. Die von allen Lösungsmitteln befreite Säure schmilzt bei 172°. Die Essigsäure-Desoxycholsäure schmilzt bei 144/45°. Die Desoxycholsäure ist optisch aktiv. $[\alpha]_D = +57{,}02°$ in Alkohol. Die Desoxycholsäure ist in Wasser schwer löslich, leichter löslich in Alkohol. Sie zeigt nicht mehr die Myliussche Jodreaktion. Ihr Geschmack ist intensiv bitter.

134) Ekbom, H. 50, 97 (1906/07).

135) Wieland und Sorge, H. 97, 1 (1916). Zur Darst. s. a. Pregl, Mh. f. Ch. 24, 21 (1904). Pregl und Buchtala, H. 74, 198 (1911).

Die Lithocholsäure. Aus Rindergallensteinen war von Küster[136]) schon die Desoxycholsäure isoliert worden. Aus dem gleichen Ausgangsmaterial konnte H. Fischer[137]) eine andere Gallensäure isolieren, die nach ihrer Herkunft den Namen Litho-cholsäure erhalten hat. Wieland und Weyland[138]) zeigten später, daß die gleiche Säure, die die Zusammensetzung $C_{24}H_{40}O_3$ hat, auch aus hydrolysierter Rindergalle zu gewinnen ist. Aber die Menge, in der die Lithocholsäure in der Galle vorkommt, tritt weit gegen die Cholsäure und Desoxycholsäure zurück. Aus 100 kg Rindergalle lassen sich 5 bis 6 kg Cholsäure, 600 bis 800 g Desoxycholsäure, aber nur 1 bis 2 g Lithocholsäure gewinnen. Die Aufarbeitung der Gallensäurefraktionen auf Lithocholsäure fußt auf der Tatsache, daß die Lithocholsäure von den drei Gallensäuren die geringste Azidität hat, in Äther leichter löslich ist und daß ihr Bariumsalz das in Wasser am schwersten lösliche ist. Die Säuren aus der Mutterlauge der Darstellung der Desoxycholsäure werden aus ihrer ätherischen Lösung fraktioniert mit Natronlauge ausgeschüttelt oder fraktioniert mit Bariumchlorid gefällt. Durch Wiederholung und Kombination der Trennungen gelingt es, die reine Lithocholsäure darzustellen.

Die Lithocholsäure kristallisiert aus Alkohol in hexagonalen Blättchen vom Schmp. 185/86°. Sie ist in Alkohol leicht löslich. 3 ccm Eisessig lösen ca. 0,2 g Lithocholsäure. Aus der Eisessiglösung kristallisiert die Säure ohne Kristall-eisessig aus. $[\alpha]_D = +32{,}7^\circ$ in abs. Alkohol. Die Säure gibt die Pettenkofersche Probe und die Fluoreszenzreaktion, aber nicht die Jod-Reaktion. Sie ist absolut geschmacklos.

Lithocholsäure und Desoxycholsäure sind Oxycholansäuren. Wieland gelang es den Nachweis zu führen, daß diese beiden begleitenden Säuren ebenso wie die Cholsäure substituierte Cholansäuren sind. Durch Erhitzen kann man aus Lithocholsäure ein Mol Wasser, aus Desoxycholsäure zwei Mol abspalten und sie so in einfach bzw. zweifach ungesättigte Säuren verwandeln. Durch katalytische Hydrierung gehen beide Säuren in die Cholansäure über. Lithocholsäure ist also eine Mono-oxy-cholansäure, Desoxycholsäure eine Di-oxy-cholansäure.

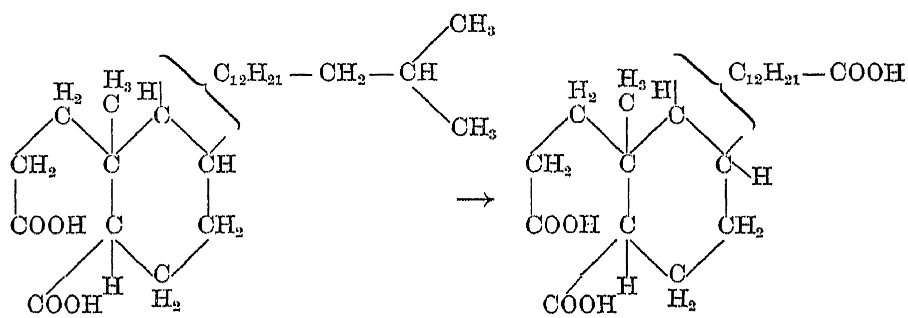
Cholensäure $C_{24}H_{38}O_2$ aus Lithocholsäure. Darst. durch Erhitzen von Lithocholsäure im Wasserstrahlvakuum auf 190° und anschließende Destillation bei 325°. Aus verd. Alkohol warzenförmig angeordnete Nädelchen. Schmp. 153/54°. Zeigt bei der Liebermann-Burchard'schen Reaktion dem

[136]) Küster, H. 69, 463 (1910).
[137]) H. Fischer, H. 73, 234 (1911).
[138]) Wieland und Weyland, H. 110, 123 (1920).

Cholesterin entsprechendes Farbenspiel. Durch Hydrierung mit Palladium und Wasserstoff entsteht Cholansäure. Wieland und Weyland, H. 110, 136 (1920).

Choladiensäure aus Desoxycholsäure. $C_{24}H_{36}O_2$. Darst. durch Erhitzen von Desoxycholsäure bei 12 mm Druck auf 300° und anschließende Destillation bei 320—40°. Aus Ligroin feine flache Nadeln, die bei 127° sintern und bei 132/33° schmelzen. Zeigt Farbreaktion bei der Liebermann-Burchard'-schen Probe. Durch Hydrierung mit Palladium und Wasserstoff entsteht Cholansäure. Wieland und Sorge, H. 98, 59 (1916).

Lithocholsäure ist eine 3-Oxycholansäure. Die Hydroxylgruppe der Lithocholsäure ist sekundär und steht in einem Ring. Durch Oxydation mit Salpetersäure läßt sich die Lithocholsäure in eine Tricarbonsäure $C_{24}H_{38}O_6$, die Litho-biliansäure[139]) verwandeln. Die beiden neuen Carboxyle dieser Säure sind durch die Aufspaltung des hydroxylhaltigen Ringes entstanden. Bei vorsichtiger Oxydation kann man zunächst nur die Hydroxylgruppe der Lithocholsäure dehydrieren. Das Reaktionsprodukt ist eine Keto-cholansäure $C_{24}H_{38}O_3$, die Dehydrolithocholsäure[140]). Die Verknüpfungen der Lithobiliansäure mit Derivaten des Cholesterins sind sehr mannigfaltig. Ihre Konstitution ergibt sich sehr leicht, wenn man mit der Dicarbonsäure aus Koprosterin den dem Übergang Koprostan-Cholansäure entsprechenden Abbau der Seitenkette vornimmt[141]). Hierbei erhält man die Lithobiliansäure, deren Konstitution sich damit, wie in der folgenden Formel dargestellt, ergibt:



Lithobiliansäure

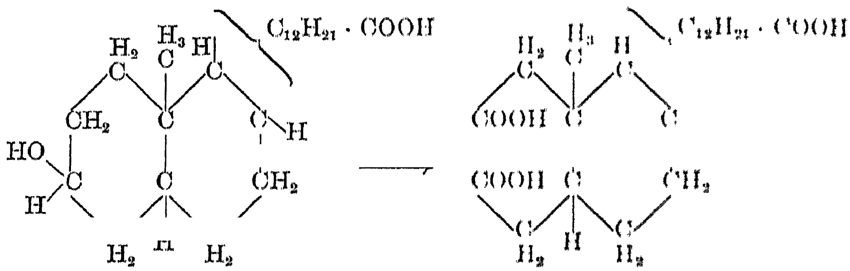
[139]) Lithobiliansäure $C_{24}H_{38}O_6$. Aus Eisessig umkristallisiert Prismen vom Schmp. 278°. Wieland und Weyland, H. 110, 139 (1920).

[140]) Dehydro-lithocholsäure $C_{24}H_{38}O_3$. Aus Alkohol umkristallisiert Blättchen vom Schmp. 140/41°. Wieland und Weyland, H. 110, 135 (1920).

[141]) R. Langer, H. 216, 189 (1933), s. a. Wieland, Dane und Scholz, H. 211, 261 (1933).

Für die Lithocholsäure bleibt noch die Frage nach der Stellung der Hydroxylgruppe offen, sie könnte an C_3 oder C_4 stehen.

Die Hydroxylgruppe der Lithocholsäure ist aber von zwei CH_2-Gruppen umgeben. Da nur zwei Möglichkeiten für ihre Lage vorhanden sind, muß sie an C_3 stehen. Man erhält nämlich bei der Oxydation der Lithocholsäure neben der schon erwähnten Lithobiliansäure in geringerer Menge eine isomere Säure, die den Namen Iso-lithobiliansäure bekommen hat[142]). Bei der Bildung dieser isomeren Säure ist die oxydative Aufspaltung des Ringes A zwischen C-Atom 2 und 3 erfolgt, wir formulieren sie wie folgt:



Litho-cholsäure — Iso-lithobiliansäure

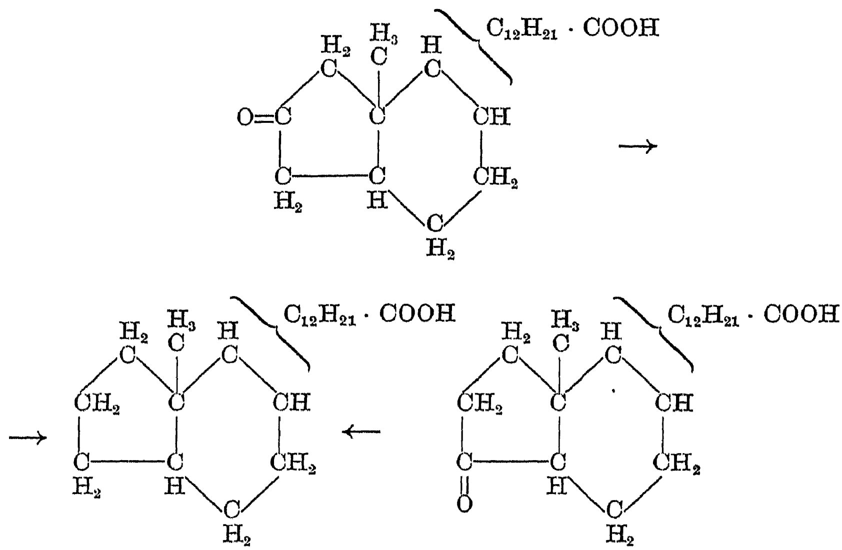
Daß die beiden Tricarbonsäuren tatsächlich struktur-isomer sind und nicht zwei Stereoisomere, läßt sich auf folgendem Wege zeigen: Bei der thermischen Cyclisierung liefert die Isolithobiliansäure eine Ketosäure $C_{23}H_{36}O_3$[143]), die von der Brenzlithobiliansäure[144]) verschieden ist. Reduziert man aber in beiden Ketosäuren die Ketogruppen, so erhält man die gleiche Desoxy-brenzsäure $C_{23}H_{38}O_2$[145]).

[142]) Isolithobiliansäure $C_{24}H_{38}O_6$. Entsteht in einer Menge von 15—20 Proz. neben Lithobiliansäure bei der Salpetersäureoxydation der Lithocholsäure. Aus Eisessig umkristallisiert. Schmp. 262°. Wieland, Dane und Scholz, H. 211, 267 (1933).

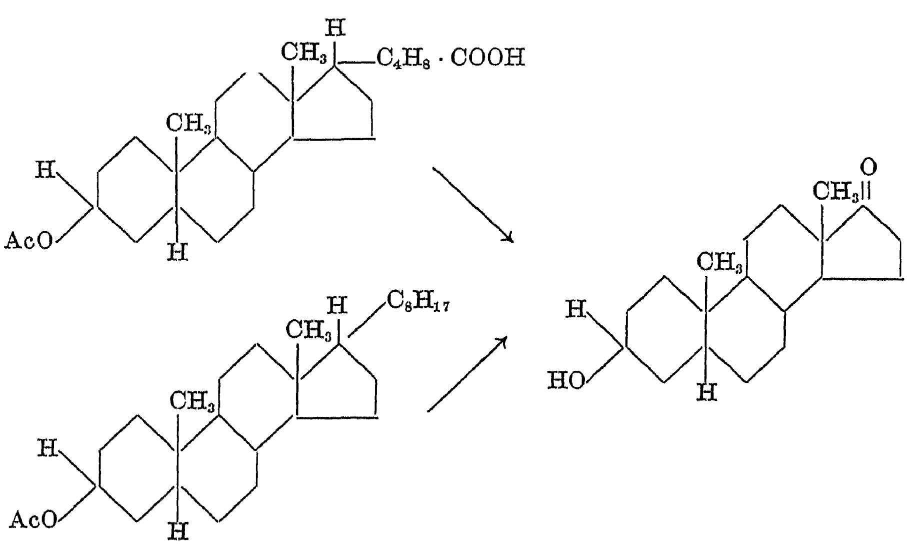
[143]) Brenzisolithobiliansäure $C_{23}H_{36}O_3$. Darst. durch Erhitzen von Isolithobiliansäure mit Essigsäureanhydrid und anschließende Destillation im Hochvakuum. Aus Aceton Blättchen vom Schmp. 168°. Methylester: Nadeln vom Schmp. 82°. Windaus, A. 447, 252 (1926).

[144]) Brenzlithobiliansäure $C_{23}H_{36}O_3$. Darst. durch Erhitzen von Lithobiliansäure auf 280—300°. Aus verd. Eisessig Nadeln vom Schmp. 200/01° (sintern ab 197°). Wieland und Weyland, H. 110, 140 (1920).

[145]) Desoxy-brenz-lithobiliansäure $C_{23}H_{38}O_2$. Darst. durch Clemmensenreduktion der Brenzlithobiliansäure oder Brenzisolithobiliansäure. Aus verd. Essigsäure feine Nadeln vom Schmp. 163°. Windaus, A. 447, 258 (1926).



R u z i c k a und G o l d b e r g[146]) konnten schließlich den Nachweis führen, daß die Acetyl-lithocholsäure durch Chromsäureoxydation in das gleiche Oxy-Keton $C_{19}H_{30}O_2$ zu verwandeln ist, das man auch bei der Oxydation des Epi-koprosterylacetats bekommen kann. In beiden Fällen wird die ganze Seitenkette entfernt und es bleibt das Vierringskelett übrig.



[146]) Helv. Ch. A. 18, 668 (1935), 17, 395 (1934). 3-epi-Oxy-ätio-cholanon-17. Schmp. 151°. $[\alpha]_D = +104{,}7°$ (Alkohol).

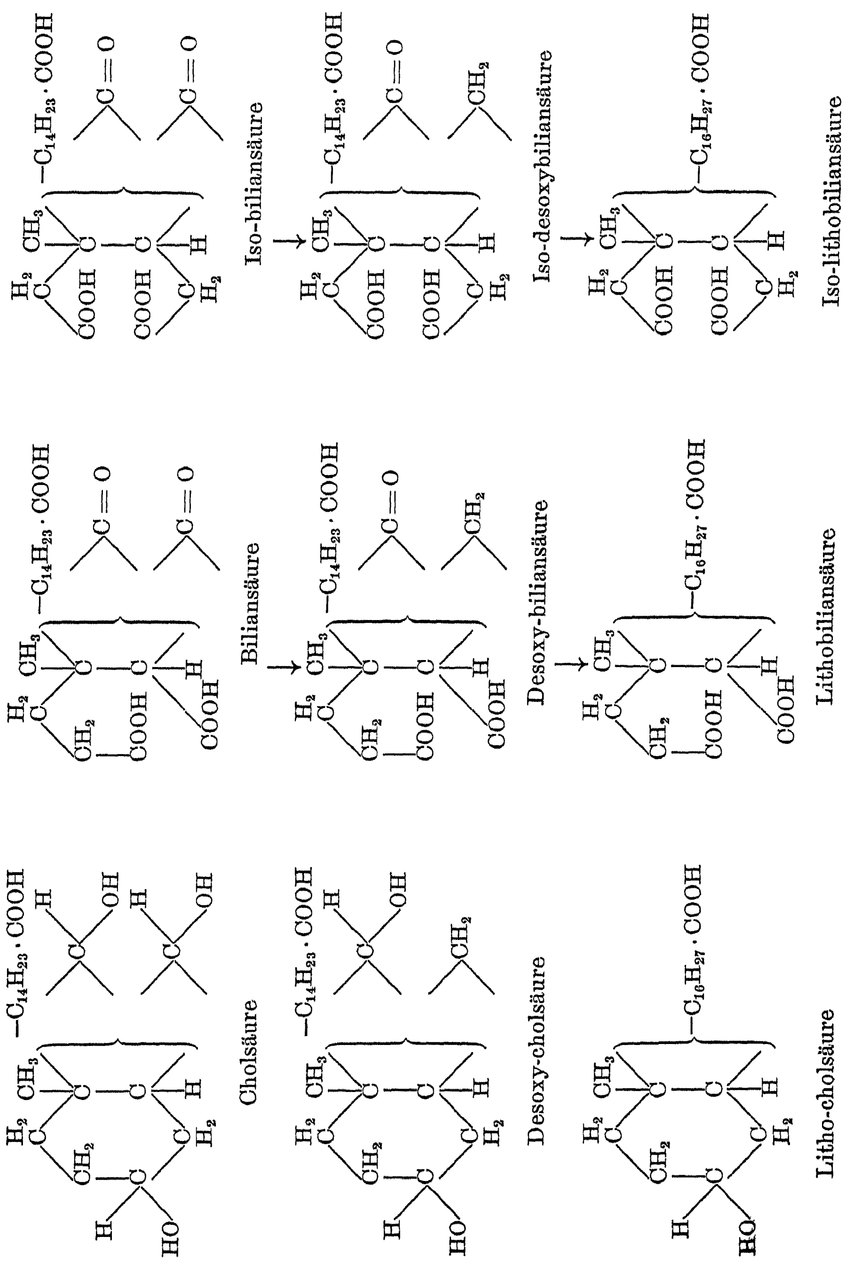
Desoxycholsäure und Cholsäure tragen eine Hydroxylgruppe an C-Atom 3 und eine weitere an entsprechenden Stellen des Moleküls. Durch Oxydation mit Permanganat geht die Cholsäure in zwei isomere Diketo-tricarbonsäuren von der Zusammensetzung $C_{24}H_{34}O_8$ über. In diesen Säuren, Biliansäure und Isobiliansäure[147]), sind zwei Hydroxyle der Cholsäure zu Ketogruppen dehydriert worden und ein hydroxyl-haltiger Ring zu einer Dicarbonsäure aufgespalten. Führt man die analoge Oxydation mit der Desoxycholsäure durch, so erhält man ebenfalls zwei isomere Säuren. Diese haben die Zusammensetzung $C_{24}H_{36}O_7$ und sind Monoketo-tricarbonsäuren. Sie werden als Desoxybiliansäure und Isodesoxybiliansäure bezeichnet[148]). Durch Reduktion nach Clemmensen läßt sich aus der Bilian- und der Iso-biliansäure eine Ketogruppe entfernen und man erhält auf diese Weise zwei Mono-ketocarbonsäuren, die mit der Desoxy-biliansäure und der Iso-desoxy-biliansäure identisch sind. Damit ist der Nachweis erbracht, daß in diesen Keto-Säuren ein Sauerstoffatom den gleichen Platz einnimmt wie in der Bilian- bzw. Iso-biliansäure, oder daß Desoxycholsäure und Cholsäure ein Sauerstoffatom am gleichen C-Atom tragen[149]). Entfernt man schließlich durch Reduktion noch die Ketogruppe aus der Desoxybiliansäure und der Iso-desoxybiliansäure, so erhält man zwei Tricarbonsäuren, die mit den schon bekannten Säuren Lithobiliansäure und Isolithobiliansäure identisch sind[150]). Damit ist gezeigt, daß in

[147]) Biliansäure und Isobiliansäure $C_{24}H_{34}O_8$. Darst. durch Oxydation der Cholsäure mit 2proz. Permanganatlösung. Trennung der beiden Säuren durch Überführung des Gemischs in die Bariumsalze. Biliansaures Barium ist in Wasser leichter löslich als das Iso-biliansaure Barium. Biliansäure: aus verd. Eisessig farbl. Prismen mit zwei Molekülen Kristallwasser Schmp. 274/75°. Isobiliansäure: aus verd. Alkohol Prismen mit einem Molekül Kristallwasser. Schmp. 244/45°. Lassar-Cohn, B. 32, 683 (1899). Pregl, Mh. f. Ch. 24, 44 (1903).

[148]) Desoxybiliansäure und Iso-desoxybiliansäure $C_{24}H_{36}O_7$. Darst. durch Oxydation von Desoxycholsäure mit Permanganat oder Salpetersäure. Trennung der beiden Isomeren durch Umkristallisation aus Eisessig, in dem die Iso-desoxybiliansäure leichter löslich ist. Darst. durch Clemmensenreduktion von Biliansäure bzw. Isobiliansäure. Desoxy-biliansäure: Aus Alkohol Nadeln, aus Eisessig Prismen vom Schmp. 296°. Iso-desoxybiliansäure: aus Alkohol Nadeln vom Schmp. 247/48°. Pregl, Mh. f. Ch. 24, 29 (1903). Wieland und Kuhlenkampff, H. 108, 296 (1919).

[149]) Borsche und Rosenkranz, B. 52, 344 (1919).

[150]) Lithobiliansäure entsteht durch Erhitzen des Disemicarbazons der Biliansäure mit Natriumaethylat. Entsprechend aus dem Monosemicarbazon der Desoxybiliansäure. Isolithobiliansäure entsteht durch Clemmensenreduktion der Iso-biliansäure oder durch Erhitzen ihres Disemicarbazons mit Natriumaethylat. Borsche und Hallwaß, B. 55, 3328 (1922). Wieland, Dane und Scholz, H. 211, 268 (1933).


Cholsäure
Biliansäure
Iso-biliansäure
Desoxy-cholsäure
Desoxy-biliansäure
Iso-desoxybiliansäure
Litho-cholsäure
Lithobiliansäure
Iso-lithobiliansäure

den Säurepaaren der Ring A aufgesprengt ist, und zwar in den Biliansäuren zwischen C_3 und C_4, in den Iso-Verbindungen zwischen C_2 und C_3. In der Cholsäure und der Desoxycholsäure muß also ebenso wie in der Lithocholsäure ein Hydroxyl am C-Atom 3 stehen. Durch Bestimmung der Lage des zweiten Hydroxyls der Desoxycholsäure ergibt sich nach diesen Experimenten gleichzeitig die Stellung eines weiteren Hydroxyls der Cholsäure.

Das zweite Hydroxyl der Desoxycholsäure steht an C-12. Die Desoxycholsäure läßt sich bei der Behandlung mit Chromsäure in eine Diketocholansäure, die Dehydro-desoxy-cholsäure $C_{24}H_{36}O_4$ verwandeln[151]). Die beiden Ketogruppen dieser Säure werden durch energische Reduktion nach Clemmensen durch Methylengruppen ersetzt, man erhält auf diese Weise ebenso wie aus der Dehydrocholsäure die Cholansäure. Unterbricht man aber die Reduktion rechtzeitig, oder führt man sie unter milderen Bedingungen durch, so bekommt man eine Monoketocholansäure von der Zusammensetzung $C_{24}H_{38}O_3$[152]), die also mit der Dehydro-lithocholsäure isomer ist und sich von ihr durch ihre physikalischen Konstanten unterscheidet. Die Ketogruppe der neuen Ketocholansäure befindet sich in einem Kohlenstoffring, denn durch Oxydation mit Salpetersäure geht die Ketocarbonsäure in eine Tricarbonsäure mit der gleichen Zahl von C-Atomen $C_{24}H_{38}O_6$ über[153]).

Destilliert man die Ketocholansäure aus der Dehydro-desoxycholsäure nach vorherigem Erhitzen auf 300—320° im Vakuum, so spaltet sie Kohlendioxyd und Wasser ab und geht in einen ungesättigten Kohlenwasserstoff $C_{23}H_{36}$, das Dehydro-norcholen, über [154]). Die

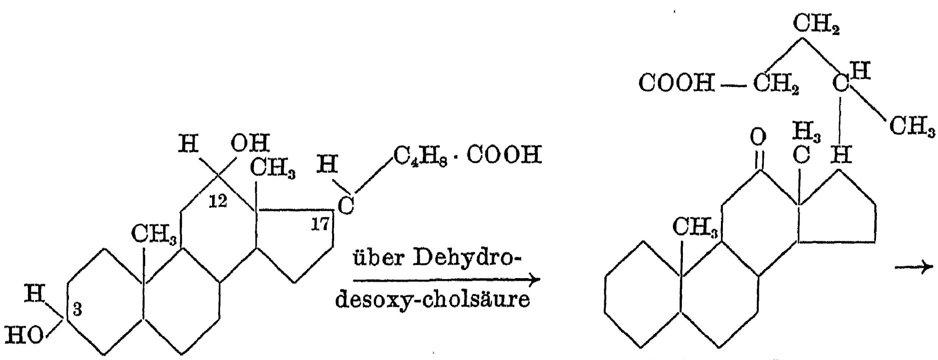
[151]) Dehydro-desoxycholsäure $C_{24}H_{36}O_4$. Darst. durch Oxydation der Desoxycholsäure mit Chromsäure. Aus 70proz. Aceton oder Alkohol Blättchen vom Schmp. 188/89°. Wieland und Sorge, H. 97, 18 (1916).

[152]) 12-Ketocholansäure $C_{24}H_{38}O_3$ (α-Cholanonsäure). Darst. durch Reduktion der Dehydro-desoxy-cholsäure in alkoholischer Lösung mit Zink und Salzsäure. Es entsteht zunächst der Aethylester der Ketocholansäure: Aus Alkohol Nadeln vom Schmp. 95°. Durch Verseifung hieraus die freie Säure: Aus Alkohol oder Eisessig breite Nadeln vom Schmp. 183°. Wieland und Boersch, H. 106, 198 (1919). Wieland, Dane und Kraft, H. 210, 281 (1932).

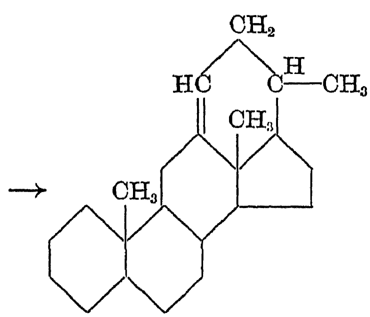
[153]) Tricarbonsäure $C_{24}H_{38}O_6$. Darst. durch Oxydation von 12-Ketocholansäure mit Salpetersäure. Aus Eisessig Nadeln vom Schmp. 261°. Bei der Destillation im Hochvakuum geht sie in eine Anhydridsäure $C_{24}H_{36}O_5$ (Blättchen vom Schmp. 173/74°) über. Wieland und Weyland, H. 110, 141 (1920).

[154]) Dehydronorcholen $C_{23}H_{36}$. Darst. durch Erhitzen von 12-Ketocholansäure auf 320—340° und anschließende Destillation im Vakuum. Aus Alkohol

Bildung dieses Kohlenwasserstoffs ist so zu deuten, daß zunächst zwischen der zur Carboxylgruppe α-ständigen Methylengruppe und der Ketogruppe Wasserabspaltung stattfindet. Die entstandene α,β-ungesättigte Carbonsäure liefert unter Kohlendioxyd-Verlust den Kohlenwasserstoff. Die Ketogruppe der Keto-cholansäure muß sich also in einer solchen Lage zur Carboxylgruppe und damit zur Seitenkette befinden, daß diese innermolekulare Perkinsche Reaktion leicht verlaufen kann. Hierfür gibt es eine Reihe von möglichen Formulierungen. Durch den weiteren Abbau des Kohlenwasserstoffs erweist sich diejenige als richtig, in der die Keto-Gruppe an C-Atom 12 und die Seitenkette an C-Atom 17 steht.



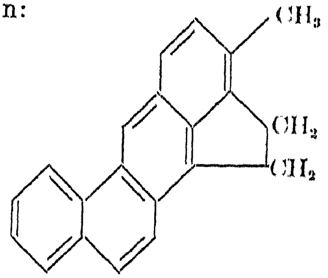
Desoxy-cholsäure — 12-Keto-cholansäure



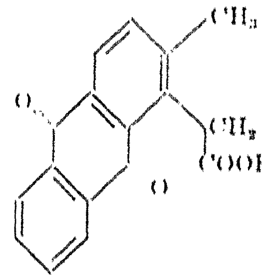
Dehydro-norcholen

lange Nadeln vom Schmp 117°. Durch Einwirkung von Benzopersäure entsteht ein Oxyd vom Schmp. 161/62°. Dehydronorcholen liefert bei der Oxydation mit Permanganat 12-Keto-norcholansäure (Schmp. 185/86°), die durch Reduktion nach Wolf-Kishner über ihr Semicarbazon in Nor-cholansäure übergeht. Wieland und Schlichting, H. 150, 273 (1925). Wieland und Wiedersheim, H. 186, 233 (1930). Cook und Haslewood, Soc. 1934, 433.

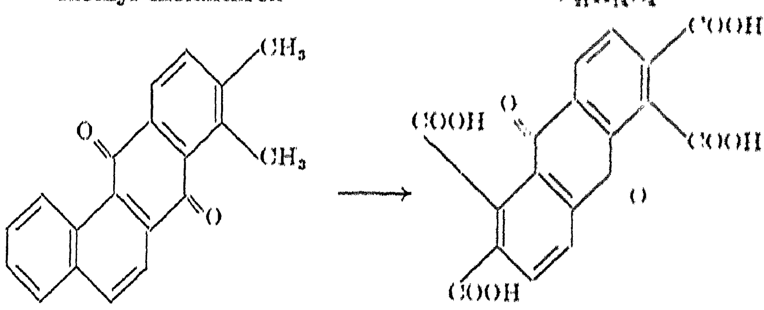
Das Dehydro-norcholen geht, wie W i e l a n d fand, bei der Dehydrierung mit Selen in einen aromatischen Kohlenwasserstoff $C_{21}H_{16}$ über[155]). C o o k und H a s l e w o o d haben diesen Kohlenwasserstoff abgebaut und seine Konstitution einwandfrei festlegen können. Durch Chromsäure-Oxydation entstand eine Säure $C_{21}H_{14}O_4$[156]), die bei 400° ein Mol Kohlendioxyd abspaltet und eine Substanz von der Zusammensetzung $C_{20}H_{14}O_2$ bildet. Durch Vergleich mit einem synthetischen Produkt wurde dieses Abbauprodukt als 5,6-Dimethyl-1,2-benz-anthrachinon erkannt. Durch Oxydation mit Permanganat ließ es sich weiter in die schon bekannte Anthrachinon-1,2,5,6-tetracarbonsäure verwandeln. Durch diese Reaktionen ist die Säure $C_{21}H_{14}O_4$ als 6-Methyl-1,2-benz-anthrachinon-5-essigsäure festgelegt. Die Konstitution des Dehydro-norcholens und des Kohlenwasserstoffs $C_{21}H_{16}$[157]) ergibt sich daraus zu den angegebenen Formeln:



Methyl-cholanthren



$C_{21}H_{14}O_4$



$C_{20}H_{14}O_2$ Anthrachinon-1, 2, 5, 6-tetracarbonsäure

155) Methyl-cholanthren $C_{21}H_{16}$. Darst. durch Behandlung von Dehydronorcholen mit Selen bei 320/40°. Gereinigt über das Pikrat (aus Benzol Nadeln vom Schmp. 177/78°) bildet das Methylcholanthren aus Benzol kristallisiert strohgelbe Nadeln vom Schmp. 176,5—177,5. Durch Hydrierung mit Natrium und Amylalkohol entsteht ein Kohlenwasserstoff $C_{21}H_{22}$ vom Schmp. 157°. W i e l a n d und D a n e, H. 219, 243 (1933). C o o k und H a s l e w o o d, Soc. 1934, 431.

156) C o o k und H a s l e w o o d, Soc. 1934, 431. C o o k, Soc. 1931, 2531.

157) F i e s e r und S e l i g m a n n (Am. Soc. 57, 942 (1935)) haben kürzlich die Synthese des Methyl-cholanthrens durchgeführt.

Wieland hat für den Grundtypus, der dem Kohlenwasserstoff $C_{21}H_{16}$ zugrunde liegt, den Namen Chol-anthren vorgeschlagen, entsprechend wird der aus dem Dehydro-norcholen dargestellte Kohlenwasserstoff als Methyl-cholanthren bezeichnet. Für die Konstitutionsaufklärung der Sterine und der Gallensäuren bringen die Versuche am Methylcholanthren die folgenden wichtigen Feststellungen:

a) die Keto-Gruppe der Keto-cholansäure aus Desoxycholsäure steht an C-Atom 12; b) die Seitenkette der Sterine und Gallensäuren geht von dem C-Atom 17 aus. Diese zweite Feststellung bringt in Kombination mit den Ergebnissen bei der Selendehydrierung der Aetiobiliansäure (s. o.) den Beweis dafür, daß die Methyl-Gruppe an C-Atom 13 haftet, denn nur so kann der Übergang der Aetiobiliansäure in 1,2-Dimethylphenanthren bei Stellung der Seitenkette an C-17 gedeutet werden.

Ein anderer Abbau, der auch von der 12-Ketocholansäure aus von Wieland und Dane durchgeführt wurde und der ebenfalls einen Beweis für die Stellung der CH_3-Gruppe an C-13 bringt, wird weiter unten in dem Abschnitt über die Stereochemie der Sterine und Gallensäuren gebracht.

Die Desoxycholsäure ist nun durch diese Untersuchungen als eine 3,12-Dioxy-cholansäure festgelegt, an diesen Stellen des Moleküls müssen ebenfalls zwei Hydroxyle der Cholsäure haften. Um über die Stellung der dritten Hydroxylgruppe der Cholsäure Auskunft zu erhalten, befassen wir uns zunächst mit zwei anderen Dioxy-cholansäuren, der Hyodesoxycholsäure und der Cheno-desoxy-cholsäure.

A II k. Die Hyo-desoxycholsäure

In der Schweinegalle kommen nach den Untersuchungen von Gundelach und Strecker und Jolin zwei gepaarte Gallensäuren vor, die α-Glyko-hyocholsäure und die β-Glyko-hyocholsäure, die sich als Natriumsalze durch ihre verschieden leichte Aussalzbarkeit mit Natriumchlorid oder -sulfat trennen lassen[158]). Hammarsten[159]) gelang es später die α-Glyko-hyocholsäure in kristallisierter Form zu isolieren. Die Arbeiten an der Säure aus Schweinegalle wurden von Windaus und seinen Mitarbeitern[160]) aufgenommen und führten zunächst zur Feststellung der richtigen Zusammensetzung der Glyko-hyocholsäure und

[158]) Gundelach und Strecker, A. 62, 205 (1847), Strecker, A. 70, 188 (1849). Jolin, H. 12, 512 (1888), 13, 205 (1889).

[159]) Hammarsten. Abderhaldens Handb. d. Biochem. Arbeitsmethod. I 6, 216 (1922).

[160]) Windaus und Bohne, A. 433, 278 (1923).

der ihr zugrunde liegenden Gallensäure. Die Glyko-hyocholsäure hat die Formel $C_{26}H_{43}O_5N$ und die freie Gallensäure die Zusammensetzung $C_{24}H_{40}O_4$. Sie ist also mit der Desoxycholsäure isomer und Windaus hat ihr daher den Namen Hyo-desoxy-cholsäure gegeben.

Die Hyo-desoxy-cholsäure kann durch Hydrolyse des kristallisierten glyko-hyo-desoxycholsauren Natriums dargestellt werden, und zwar muß man, da dieser Stoff sehr viel schwieriger zu verseifen ist als die entsprechenden gepaarten Rindergallensäuren, die Hydrolyse im Autoklaven vornehmen. 10 g des Salzes werden mit 100 ccm 15proz. Kalilauge 6 Stunden auf 135° erhitzt. Die alkalische Lösung wird mit Wasser verdünnt, bis sie klar geworden ist, und dann mit Salzsäure versetzt, wodurch die Gallensäure ausgefällt wird. Ein vereinfachtes Verfahren zur Gewinnung der Hyodesoxycholsäure haben Wieland und Mitarbeiter[161]) angegeben.

Die ausgefällte, getrocknete Säure wird aus wenig Essigester umkristallisiert. Aus diesem Lösungsmittel kristallisiert sie in feinen Nadeln. Aus Alkohol, Eisessig, Benzol erhält man vierseitige Blättchen, Schmp. 196/97°. Die Säure gibt die Pettenkofer'sche Reaktion. Sie bildet keine Choleinsäuren wie die Desoxycholsäure und ist völlig geschmacklos.

Die Hyo-desoxycholsäure ist eine Dioxy-cholansäure. Durch Behandlung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin geht die Hyo-desoxycholsäure in ein Diacetylderivat über, das bei der Reaktion mit Diazomethan einen Methylester bildet. Die Funktionen der Sauerstoffatome der Hyo-desoxy-cholsäure sind damit eindeutig festgelegt: sie ist eine Dioxy-monocarbonsäure. Die Bestimmung der zugehörigen hydroxylfreien Säure ist jedoch nicht einfach, denn die beiden Wege, die von der Cholsäure zur Cholansäure führen, bringen in diesem Fall nicht ganz eindeutige Ergebnisse.

Bei der Destillation im Wasserstrahlvakuum bei 320—40° spaltet die Hyodesoxycholsäure zwei Mol Wasser ab und geht in eine zweifach ungesättigte Carbonsäure $C_{24}H_{36}O_2$, die Hyo-choladiensäure, über. Diese Säure nimmt bei der katalytischen Hydrierung glatt zwei Mol Wasserstoff auf und geht in eine gesättigte Carbonsäure $C_{24}H_{40}O_2$ über, die aber keine einheitliche Substanz darstellt, sondern ein Gemisch, aus dem Cholansäure und Allo-cholansäure in Form ihrer Ester herausfraktioniert werden konnten.

Bei der vorsichtigen Oxydation mit Chromsäure erhält man aus der Hyo-desoxycholsäure eine Diketosäure $C_{24}H_{36}O_4$. Diese Säure liefert nun bei der Reduktion nach Clemmensen in glatter Reaktion die Allo-cholansäure $C_{24}H_{40}O_2$, d. h. die Säure, die Windaus durch den oxydativen Abbau der Seitenkette des Cholestans erhalten hatte. Hiernach könnte es zunächst erscheinen, als ob die Hyo-desoxycholsäure ein Derivat der Allo-cholansäure sei. Die Diketo-carbonsäure lagert sich aber unter den Bedingungen der Clemmensenreduktion, durch Erwärmen mit Eisessig und Salzsäure, in eine isomere Säure um, die ebenfalls bei der Reduktion die

[161]) Wieland, Dane, Martius und Gumlich, H. 215, 18 (1933).

Allo-cholansäure liefert. Man bezeichnet die zuerst entstandene Säure als die α-Säure, die isomere als β-Säure. Es liegt danach die Vermutung nahe, daß die Hyodesoxycholsäure selbst ein Derivat der Cholansäure ist, daß aber eine ihrer Hydroxylgruppen in Nachbarschaft zu dem Asymmetriezentrum an C_5, also an C—4 oder C—6 steht. Die zunächst entstandene α-Diketosäure, ein Derivat der Cholansäure, hätte sich dann über die Zwischenstufe der Enolform in das Derivat der Allo-cholansäure, die β-Diketosäure umgelagert. Entsprechend könnte auch durch die Wasserabspaltung eine Doppelbindung entstanden sein, die vom C-Atom 5 ausgeht, so daß damit die Möglichkeit gegeben ist, daß bei der Hydrierung Gemische von Cholansäure und Allocholansäure entstehen.

Den sicheren Beweis dafür, daß die Hyo-desoxycholsäure tatsächlich ein Derivat der Cholansäure ist, hat Windaus durch ihre Umwandlung in Lithobiliansäure erbracht. Bei der Oxydation mit Natriumhypobromit geht die Hyo-desoxycholsäure in eine Oxy-tricarbonsäure $C_{24}H_{38}O_7$ über. Aus dieser läßt sich durch Reduktion mit Jodwasserstoffsäure die Hydroxylgruppe entfernen, das Reaktionsprodukt ist mit der Lithobiliansäure identisch. Die Lithobiliansäure ist ein Derivat der Cholansäure. Da unter den Bedingungen der Oxydation und Reduktion eine Umlagerung nicht anzunehmen ist, ist damit der Nachweis geführt, daß die Hyodesoxycholsäure ein Derivat der Cholansäure, eine Dioxy-cholansäure ist.

Hyo-choladiensäure $C_{24}H_{36}O_2$. Rosetten feiner Nädelchen, die bei 135° zu sintern beginnen und bei 142° schmelzen. Liebermann-Burchard'sche Farbreaktion positiv.

α-Dehydro-hyo-desoxycholsäure $C_{24}H_{36}O_4$. Aus verdünntem Alkohol vierseitige Blättchen, die 1 Mol Kristallwasser enthalten. Schmp. 161,5—162°. $[\alpha]_D = -65{,}9°$ (Alkohol). Methylester: Blättchen vom Schmp. 139°. Aethylester: Schmp. 140°.

β-Dehydro-hyo-desoxycholsäure $C_{24}H_{36}O_4$. Darst. durch Erwärmen der α-Säure mit Eisessig-Salzsäure oder durch Destillation oder Alkali-Behandlung der α-Säure. Aus verd. Alkohol Blättchen vom Schmp. 209/10°, die kein nachweisbares Drehungsvermögen besitzen. Methylester: Aus Äther-Petroläther kurze Nadeln, Schmp. 148°.

Oxy-lithobiliansäure $C_{24}H_{36}O_7$. Aus Essigester und verd. Methylalkohol umkristallisiert Nadeln vom Schmp. 257°. Trimethylester aus verd. Methanol Nadeln vom Schmp. 117/18°. Durch Erhitzen mit Eisessig, Jodwasserstoff und rotem Phosphor entsteht Lithobiliansäure. Windaus und Bohne, A. 433, 278 (1923). Windaus, A. 447, 233 (1926).

Die Hyo-desoxycholsäure ist eine 3,6-Dioxycholansäure. Durch weitere Untersuchung der Oxy-lithobiliansäure kommt man zu dem Ergebnis, daß eine Hydroxylgruppe der Hyo-desoxycholsäure an C-Atom 6 stehen muß, während die andere durch den Übergang in Lithobiliansäure ihren Platz an C-Atom 3 oder 4 findet. Bei der Behandlung mit Natriumaethylat spaltet die Oxy-lithobiliansäure ein

Molekül Wasser ab[162]). Die hierbei entstandene Litho-biliensäure $C_{24}H_{36}O_6$ geht bei der katalytischen Hydrierung in eine mit der Lithobiliansäure isomere Säure, die Allo-lithobiliansäure, über[163]). Diese beiden Säuren sind aber nur durch die verschiedene sterische Anordnung der Substituenten an C-Atom 5 voneinander unterschieden, im übrigen sind sie strukturidentisch. Bei der Cyclisierungsreaktion geht die neue Tricarbonsäure in die gleiche Brenzlithobiliansäure über, die man auch aus Lithobiliansäure bekommen kann. Der Fall liegt hier also genau so wie bei der Dicarbonsäure aus Koprosterin und der Dihydro-dielssäure. Um das Auftreten dieser Stereoisomerie an C-Atom 5 zu deuten, müssen wir annehmen, daß die Doppelbindung der Lithobiliensäure von C-5 nach C-6 geht, d. h. die Hydroxylgruppe muß ursprünglich an C-6 gestanden haben.

Die Oxy-lithobiliansäure liefert bei der Chromsäureoxydation eine Keto-dicarbonsäure $C_{23}H_{36}O_5$; aus einer primär gebildeten Keto-tricarbonsäure ist ein Mol Kohlendioxyd abgespalten worden. In Übereinstimmung mit der obigen Ableitung befindet sich die neu gebildete Ketogruppe an C-6 in β-Stellung zu einem Carboxyl, wodurch die leichte Abspaltung von Kohlendioxyd ihre Erklärung findet.

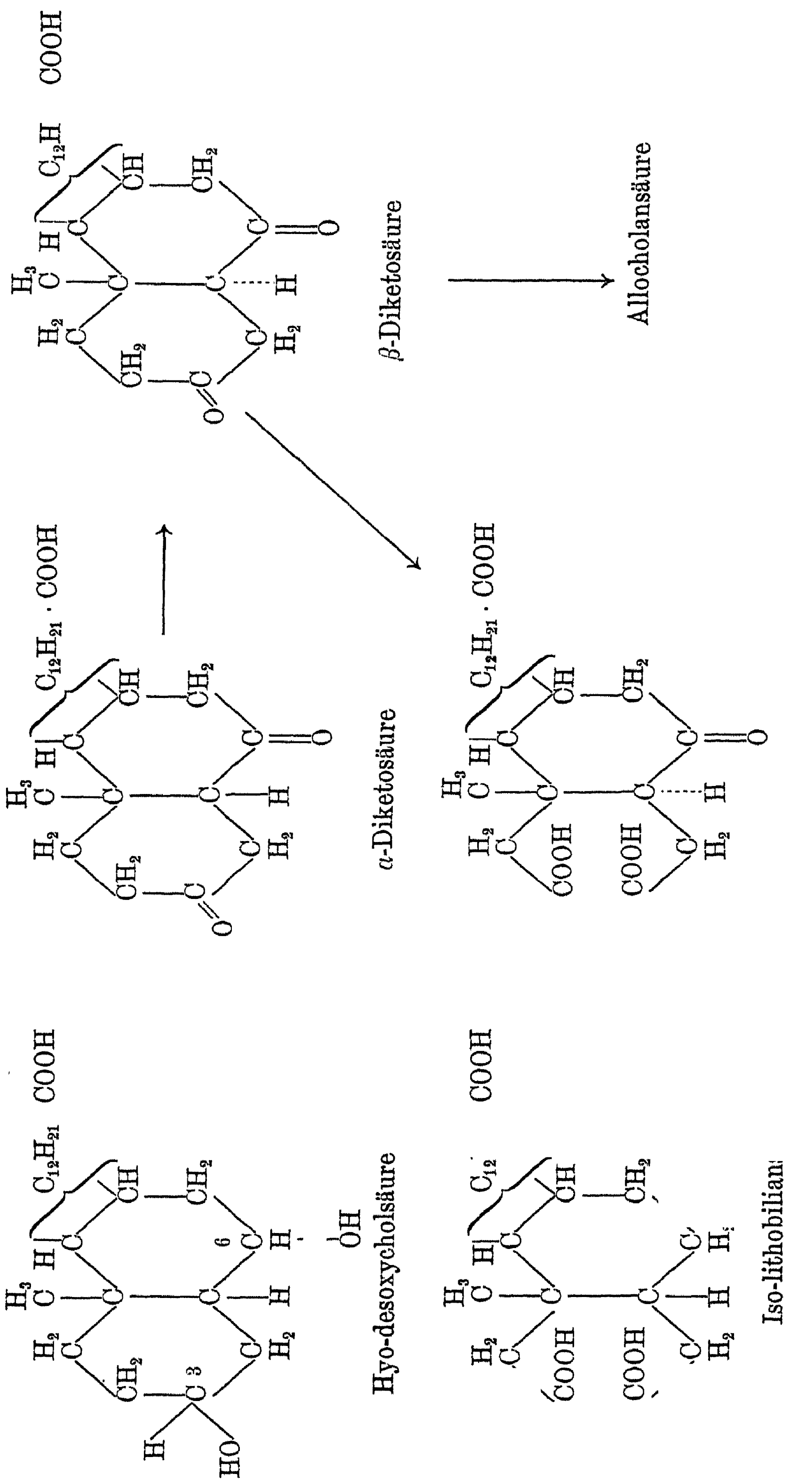
Bei der Oxydation der β-Dehydro-hyo-desoxycholsäure mit Permanganat oder Hypobromit entsteht eine Ketotricarbonsäure $C_{24}H_{36}O_7$[164]), die sich über ihr Hydrazinkondensationsprodukt nach der Reduktionsmethode von Wolff-Kishner in Iso-lithobiliansäure verwandeln läßt. Durch die Umwandlungen der Hyo-desoxy-cholsäure in Lithobiliansäure und Isolithobiliansäure ist die Stellung des anderen Hydroxyls an C-Atom 3 bewiesen. Hyo-desoxycholsäure ist eine 3,6-Dioxycholansäure.

Die Hyo-desoxycholsäure stellt, da sie sich so leicht in Allocholansäure verwandeln läßt, ein wichtiges Ausgangsmaterial zur Darstellung dieser Säure dar. Aber auch substituierte Allo-cholansäuren lassen sich aus ihr

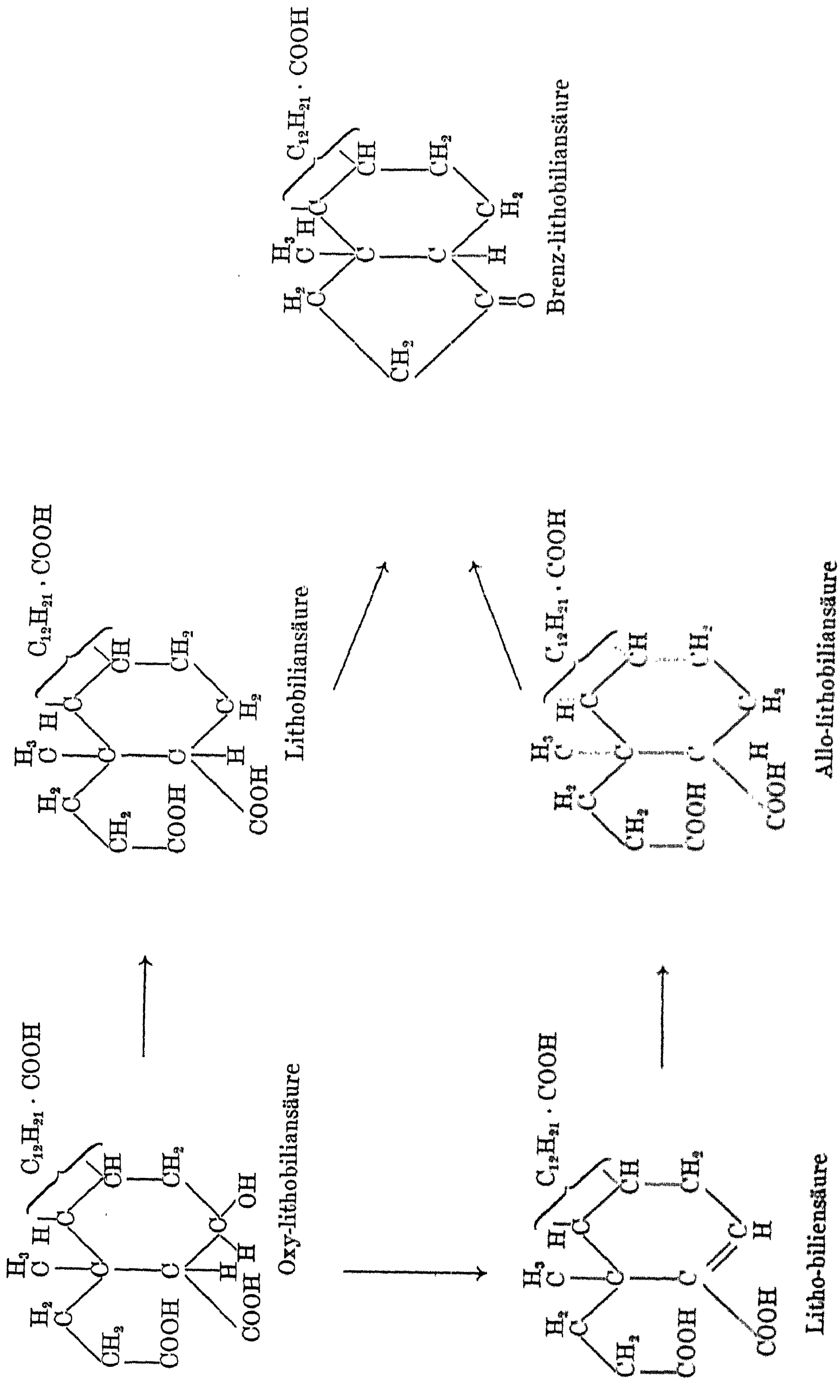
[162]) Lithobiliensäure $C_{24}H_{36}O_6$. Darst. durch Erhitzen von Oxylithobiliansäure mit Natriumaethylat auf 195°. Aus Äther-Petroläther lange Nadeln vom Schmp. 197°. Trimethylester Nadeln vom Schmp. 99°. Windaus A. 447, 255 (1926).

[163]) Allo-lithobiliansäure $C_{24}H_{38}O_6$. Aus verd. Essigsäure umkristallisiert Nadeln vom Schmp. 212°. Trimethylester Nadeln vom Schmp. 101°. Windaus, A. 447, 255 (1926).

[164]) Ketotricarbonsäure $C_{24}H_{36}O_7$. Aus Alkohol oder verd. Essigsäure umkristallisiert kleine Drusen vom Schmp. 245°. Trimethylester aus Methanol Tafeln vom Schmp. 129/30°. Durch Kondensation mit Hydrazinhydrat entsteht eine Verbindung $C_{24}H_{40}O_5N_4$ vom Schmp. 228°. Hieraus durch Erhitzen mit Natriumaethylat entsteht Iso-lithobiliansäure neben einer isomeren Säure. Windaus, A. 447, 249 (1926).



Hyo-desoxycholsäure
α-Diketosäure
β-Diketosäure
Allocholansäure
Iso-lithobilian


Oxy-lithobiliansäure
Lithobiliansäure
Brenz-lithobiliansäure
Litho-biliensäure
Allo-lithobiliansäure

darstellen. Wieland und Dane[165]) konnten zeigen, daß die Hyodesoxycholsäure bei vorsichtiger Oxydation mit Chromsäure zunächst nur am C-Atom 6 dehydriert wird. Es entsteht eine 3-Oxy-6-ketocholansäure, aus der man durch Reduktion nach Wolf-Kishner die Ketogruppe entfernen kann. Man kommt so zu der 3-Oxy-allocholansäure (daneben entsteht Litho-cholsäure)[166]). Durch Wasserabspaltung gewinnt man aus der 3-Oxy-6-ketocholansäure eine ungesättigte Ketosäure, die sich in die 6-Keto-allocholansäure verwandeln läßt[167]). Diese beiden Derivate der Allocholansäure lassen sich durch Abspaltung der Isopropyl-Gruppe aus den entsprechenden Derivaten des Cholestans darstellen. Windaus und Hoßfeld[166]) oxydierten 3-Chlor-cholestan zu der 3-Chlor-allocholansäure und stellten daraus die 3-Oxy-allocholansäure dar, die mit der Oxy-Säure aus Hyodesoxycholsäure identisch war. Ganz analog hat Stange[167]) das 6-Chlor-cholestan in die 6-Keto-allocholansäure übergeführt.

A II l. Die Cheno-desoxy-cholsäure

Über die Gallensäure der Gänsegalle liegen eine Reihe von älteren Arbeiten vor[168]). Heintz und Wislicenus konnten zeigen, daß hier eine mit Taurin gepaarte Gallensäure vorkommt, die „Tauro-cheno-cholsäure", die durch Verseifung in Taurin und „Cheno-cholsäure" gespalten wird. Dieser Säure wurde zuerst eine Formel mit 27 C-Atomen zugeschrieben, doch stellten spätere Arbeiten von Windaus und Mitarbeitern[169]) eine andere Zusammensetzung: $C_{24}H_{40}O_4$ fest. Die Säure ist also ein Isomeres der Desoxycholsäure und Windaus hat ihr daher den Namen Cheno-desoxycholsäure gegeben. Wieland und Reverey[170]) isolierten die gleiche Säure aus Menschengalle und haben sie als Anthropo-desoxycholsäure bezeichnet. Da diese Säure aber der charakteristische Bestandteil der Vögelgalle ist und in der menschlichen Galle mengenmäßig gegen Cholsäure und Desoxycholsäure zurücktritt, ist der Name Cheno-desoxycholsäure vorzuziehen.

Zur Darstellung der Cheno-desoxy-cholsäure wird Gänsegalle, die mit Alkohol schleimfrei gemacht ist, im Autoklaven mit Kalilauge bei 130—40° verseift. Die mit Salzsäure ausgefällten Säuren werden in Alkohol gelöst und nach Zusatz von Wasser durch Ausschütteln mit Petroläther von Fett-

165) Wieland und Dane, H. 212, 44 (1932).

166) Wieland und Dane, H. 212, 47 (1932). Wieland und Dane und Martius, H. 215, 15 (1933). Windaus und Hoßfeld, H. 145, 182 (1925).

167) Wieland und Dane, H. 212, 48 (1932). O. Stange, H. 220, 34 (1933).

168) Gmelin und Tiedemann, Berzelius, Lehrb. d. Chem. IX, 297 (1840). Marsson, Arch. d. Pharmacie 58, 138 (1849). Heintz und Wislicenus, Pogg. Ann. 108, 547 (1859). Otto, A. 149, 185 (1869).

169) Windaus, Bohne und Schwarzkopf, H. 140, 177 (1924).

170) Wieland und Reverey, H. 140, 186 (1924).

säuren befreit. Der Rückstand der wäßrig-alkoholischen Lösung wird getrocknet und in Alkohol gelöst. Nach dem Kochen mit einer Lösung von alkoholischer Natronlauge scheidet sich beim Einengen ein dicker Kristallbrei von chenodesoxycholsaurem Natrium aus. Hieraus wird durch Ansäuern die freie Säure dargestellt. Sie zeigt ein sehr geringes Kristallisationsvermögen. Aus einer Essigesterlösung scheidet sie sich in eigenartigen, gequollenen opaleszierenden Drusen aus, die beim Liegen an der Luft zusammenschrumpfen. Das Produkt schmilzt nach dem Trocknen bei 100° bei 140°. $[\alpha]_D = +11{,}1^{\circ}$ (in Alkohol). Das Bariumsalz der Säure bildet lange Nadeln. Die Cheno-desoxycholsäure ist nahezu geschmacklos. Sie bildet keine Choleinsäuren, doch hält sie Kristallisations-Eisessig auch sehr zähe fest. Sehr empfindlich ist die Farbreaktion nach Liebermann-Burchard. Hierbei bildet sich eine tief braunrote Färbung (in dünner Schicht kirschrot), die allmählich in Braunoliv übergeht.

Die Cheno-desoxycholsäure ist eine 3,7 Dioxycholansäure. Bei der Oxydation mit Chromsäure entsteht aus der Cheno-desoxy-cholsäure eine Diketocarbonsäure $C_{24}H_{36}O_4$, die Dehydro-cheno-desoxycholsäure[171]). Sie läßt sich durch Reduktion nach Clemmensen glatt in Cholansäure überführen. Bei dem Versuch, das Monosemicarbazon der Dehydro-Säure nach Wolf-Kishner mit Natriumaethylat zu reduzieren, beobachteten Wieland und Jacobi[172]) die Bildung von Lithocholsäure. Außer der Reduktion einer Ketogruppe war also eine Hydrierung durch das Natriumäthylat eingetreten. Damit ist die Stellung einer Hydroxylgruppe am C-Atom 3 festgelegt. Die zweite muß sich, wie die folgenden Versuche zeigen, in Ring B befinden. Bei energischerer Oxydation mit Chromsäure geht die Cheno-desoxycholsäure in eine Keto-tricarbonsäure $C_{24}H_{36}O_7$ über[173]), die sich durch Clemmen-

---

[171]) Windaus, Bohne und Schwarzkopf, H. 140, 181 (1924). Die Umwandlung der Cheno-desoxycholsäure in Cholansäure ist auch durch katalytische Hydrierung der Cheno-chola-diensäure (Schmp. 138°) durchgeführt worden. Wieland und Reverey, H. 140, 201 (1924).

[172]) Wieland und Jacobi, H. 148, 240 (1925).

[173]) Keto-tricarbonsäure $C_{24}H_{36}O_7$ (Cheno-desoxy-biliansäure). Schmp. 230°. Trimethylester: aus Methanol Blättchen vom Schmp. 92°. Durch Clemmensenreduktion entsteht Lithobiliansäure. Windaus, Bohne und Schwarzkopf, H. 140, 183 (1924). Pentacarbonsäure $C_{24}H_{36}O_{10}$ (Chenocholoidansäure). Darst. durch Oxydation von Cheno-desoxycholsäure oder der Dehydro-säure oder der Cheno-desoxybiliansäure mit rauchender Salpetersäure bei 40°. Aus Eisessig oder verd. Alkohol feine Nadeln vom Schmp. 213° (unter Aufschäumen). Wieland und Jacobi, H. 148, 241 (1925). Windaus und van Schoor, H. 157, 182 (1926). Tetracarbonsäure $C_{23}H_{36}O_8$. Darst. durch ½stündiges Erhitzen der Pentacarbonsäure auf 212°. Aus 40proz. Essigsäure umkristallisiert derbe sechsseitige Kristalle vom Schmp. 219/220°. Wieland und Jacobi, H. 148, 242 (1925). Windaus und van Schoor, H. 157, 183 (1926).

senreduktion in Lithobiliansäure verwandeln läßt. Durch Oxydation mit Salpetersäure läßt sich in der Keto-tricarbonsäure der Ring mit der Ketogruppe oxydativ aufspalten, man erhält eine Pentacarbonsäure. Diese verhält sich nun wie eine substituierte Malonsäure: beim Erhitzen auf den Schmelzpunkt spaltet sie ein Mol Kohlendioxyd ab und geht in eine Tetracarbonsäure über. Eine der neu entstandenen Carboxylgruppen muß sich also in β-Stellung zu der Carboxylgruppe der Keto-lithobiliansäure an C-Atom 5 befinden, d. h. die Carboxyle sind durch Aufspaltung des Ringes B entstanden, in dem die zweite Hydroxylgruppe der Chenodesoxycholsäure liegen muß. Für ihre Stellung würden die C-Atome 6 und 7 in Frage kommen. Da die 6-Stellung schon für die Hyo-desoxycholsäure vergeben ist und auch die Dehydrosäuren aus Hyo- und Cheno-desoxycholsäure verschieden sind, bleibt nur die Stellung an C-Atom 7 möglich. Cheno-desoxycholsäure ist eine 3,7-Dioxycholansäure.

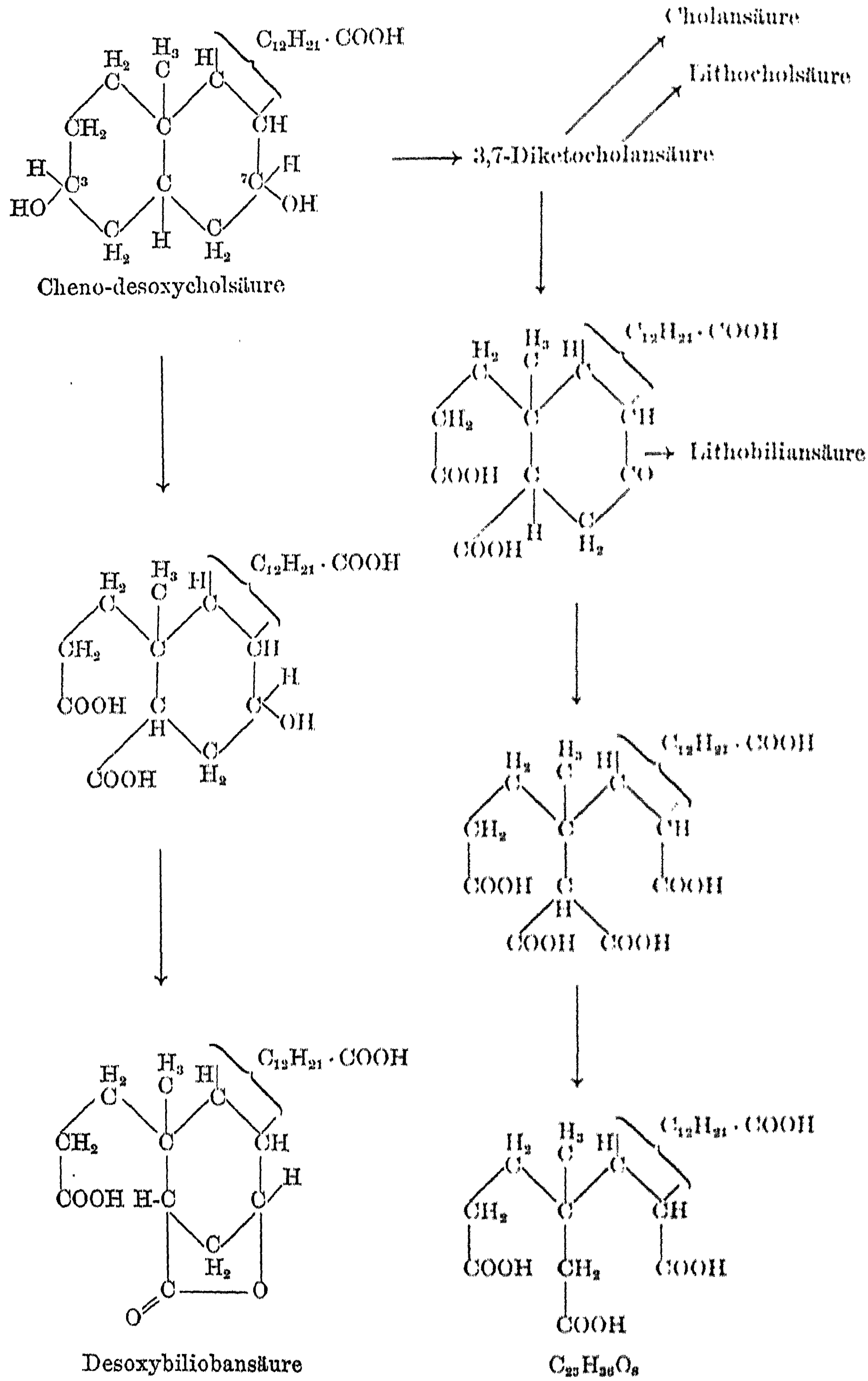
Damit in Übereinstimmung steht ein anderer Abbau, der an der Cheno-desoxycholsäure durchgeführt wurde. Bei der Oxydation mit Hypobromit verwandelt sie sich in eine Lactondisäure $C_{24}H_{36}O_6$[174]). Es gelang Borsche[175]) diese Säure in Beziehung zur Biliansäure zu setzen, für die die Aufspaltung zwischen C_3 und C_4 sichergestellt ist. Die Reaktion ist also wie unten angegeben zu formulieren.

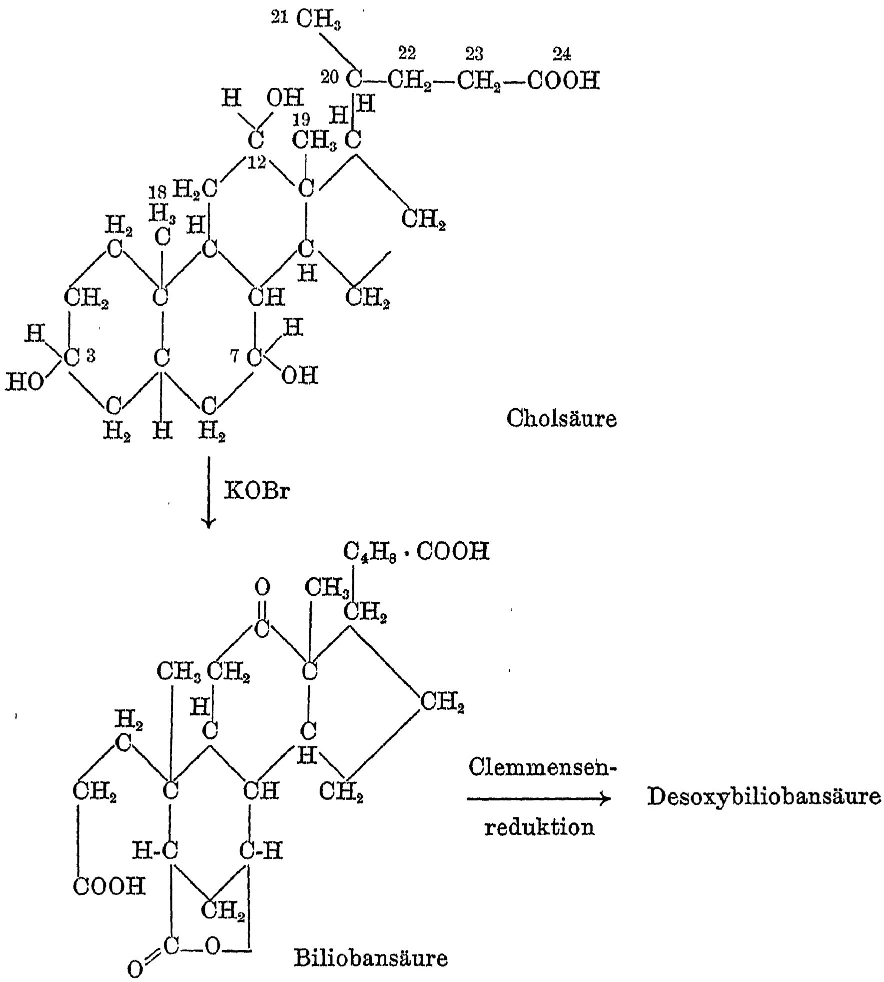
A II m. Cholsäure ist eine 3,7,12-Trioxy-cholansäure

Aus den bisherigen Untersuchungen an der Cholsäure hatte sich ergeben, daß zwei der Hydroxyle sich in der gleichen Stellung befinden wie in der Desoxycholsäure, also an C-Atom 3 und 12. Durch Oxydation mit Kaliumhypobromit geht die Cholsäure in eine Keto-lacton-dicarbonsäure $C_{24}H_{34}O_7$, die sog. Biliobansäure über. Entfernt man aus dieser durch Reduktion nach Clemmensen die Keto-Gruppe an C-Atom 12, so erhält man eine Lacton-dicarbonsäure $C_{24}H_{36}O_6$, die mit der aus Chenodesoxycholsäure dargestellten identisch ist. Die Cholsäure trägt also das dritte Hydroxyl ebenso wie die Chenodesoxy-cholsäure. Sie ist eine 3,7,12-Trioxycholansäure.

174) Lactondicarbonsäure $C_{24}H_{36}O_5$ Desoxy-biliobansäure. Aus Essigester glitzernde Blättchen vom Schmp. 253°. Dimethylester: aus Methanol lange Nadeln vom Schmp. 107°. Die Desoxybiliobansäure läßt sich durch 15proz. Kalilauge in eine Oxytricarbonsäure verwandeln, die sich dreibasisch titrieren läßt und beim Ansäuern die Lactonsäure zurückliefert. Windaus und van Schoor, H. 148, 230 (1925), 157, 184 (1926).

175) Borsche und Franck, B. 59, 1753 (1926).


Cheno-desoxycholsäure
3,7-Diketocholansäure
Cholansäure
Lithocholsäure
Lithobiliansäure
Desoxybiliobansäure
$C_{23}H_{36}O_8$



Biliobansäure $C_{24}H_{34}O_7$. Aus 50proz. Alkohol umkristallisiert lange Nadeln, die sich ab 285° zersetzen und bei 304° schmelzen. Dimethylester: aus Methanol lange Nadeln vom Schmp. 186°. Oxim des Dimethylesters: aus Methanol Rosetten von Nadeln, die bei 187° schmelzen. Pringsheim, B. 48, 1324 (1915). Wieland und Fukelmann, H. 130, 144 (1923). Borsche und Franck, B. 59, 1753 (1926).

Einige Umwandlungsprodukte der Cholsäure. Durch Entfernung einer oder mehrerer Hydroxylgruppen lassen sich aus der Cholsäure eine Reihe von bekannten Stoffen und auch solche Derivate, die man aus den Gallen noch nicht isoliert hat, darstellen. Von derartigen Umwandlungen hat die Darstellung der schwer zugänglichen Lithocholsäure besonderes Interesse. Die Dehydro-cholsäure läßt sich durch milde Reduktionsmittel in die 3-Oxy-7,12-diketocholansäure, die

sog. Redukto-dehydrocholsäure[176]) überführen, deren Disemicarbazon durch Reduktion nach Wolf-Kishner in Lithocholsäure übergeht[177]). Die Clemmensenreduktion der Dehydrocholsäure in alkoholischer Lösung bewirkt nur die Reduktion der Ketogruppe an C-3, es entsteht die 7,12-Diketocholansäure[178]). Die katalytische Hydrierung der Dehydrocholsäure verlangsamt sich nach der Aufnahme von 2 Mol Wasserstoff etwas. Unterbricht man die Hydrierung zu diesem Zeitpunkt, so kann man die 3,7-Dioxy-12-keto-cholansäure fassen, die sich durch Reduktion nach Wolf-Kishner in die Cheno-desoxycholsäure verwandeln läßt[179]).

Die Umwandlung der Cholsäure in Desoxycholsäure ist zwar im Prinzip durchgeführt, doch ist der Weg präparativ nicht ergiebig. Bei der Einwirkung von wasserabspaltenden Mitteln auf Cholsäure (Zinkchlorid, Antimontrichlorid oder Salzsäure in Eisessig) wird nur die Hydroxylgruppe an C-7 entfernt. In geringer Menge entsteht die 3,12-Dioxy-7,8-cholensäure, deren Konstitution durch Wieland und Mitarbeiter aufgeklärt wurde. Sie geht durch katalytische Hydrierung in Desoxycholsäure über. Das Hauptprodukt bei der Wasserabspaltung ist aber die sog. Apocholsäure, die durch Verschiebung der Doppelbindung aus der erst genannten Substanz entsteht. In ihr liegt die Doppelbindung zwischen zwei tertiären C-Atomen, zwischen C-8 und C-9 oder C-8 und C-14. In dieser Lage ist die Doppelbindung gegen katalytische Hydrierung so außerordentlich beständig, daß sogar gelegentlich Zweifel geäußert wurden, ob die Apocholsäure überhaupt eine Doppelbindung habe. Die Apocholsäure ist darum noch interessant, weil sie ebenso wie die Desoxycholsäure die sog. Choleinsäuren, Anlagerungsverbindungen mit organischen Substanzen, zu bilden vermag. Durch Behandlung mit starker Salzsäure lagert sie sich in eine isomere Säure um[180]).

[176]) Nadeln vom Schmp. 186/87°. Hammarsten, B. 14, 71 (1881). Schenk, H. 63, 308 (1909), 69, 383 (1910). Borsche und Hallwass, B. 55, 3318 (1922).

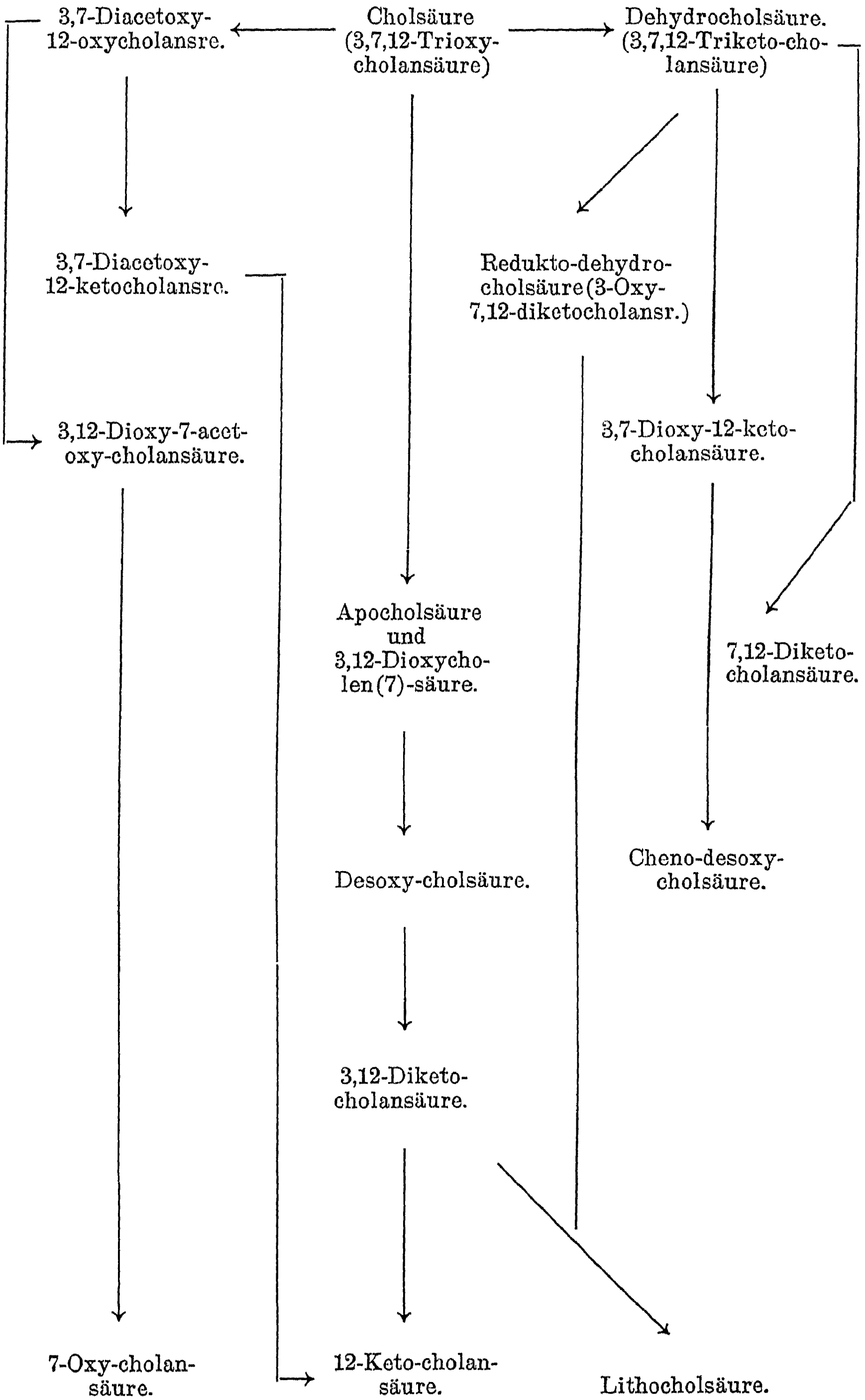
[177]) Borsche und Hallwass, B. 55, 3326 (1922). Ruzicka u. a. Helv. Ch. A. 18, 672 (1935). Darst. aus Desoxycholsäure: Wieland, Dane und Scholz, H. 211, 266 (1932).

[178]) Schmp. 177°. Methylester Schmp. 136°. Wieland und Boersch, H. 106, 190 (1919). Borsche, B. 52, 1363 (1919).

[179]) Kawai, H. 214, 71 (1933).

[180]) Dioxy-cholensäure: Boedecker und Volk, B. 54, 2489 (1921). 55, 2302 (1922). Wieland und Dane, H. 212, 263 (1932). Nadeln vom Schmp. 259/60° (korr.). $[\alpha]_D = +57{,}3°$ (in Alkohol).

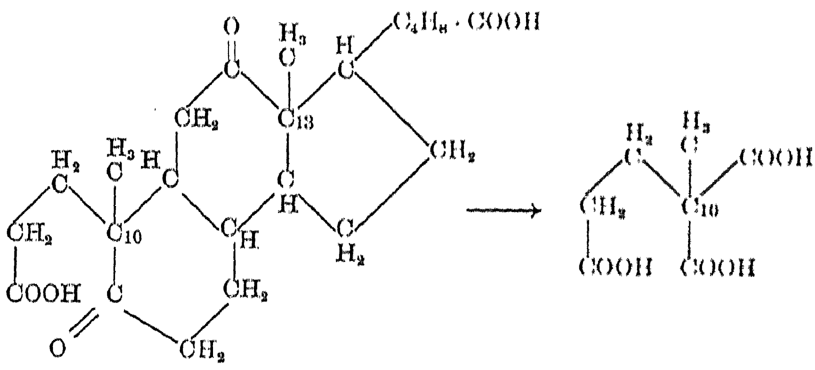
Apocholsäure: B. 53, 1852 (1920), 55, 2302 (1922). Schmp. der lösungs-


3,7-Diacetoxy-12-oxycholansre.
Cholsäure (3,7,12-Trioxy-cholansäure)
Dehydrocholsäure. (3,7,12-Triketo-cholansäure)
3,7-Diacetoxy-12-ketocholansre.
Redukto-dehydro-cholsäure (3-Oxy-7,12-diketocholansr.)
3,12-Dioxy-7-acet-oxy-cholansäure.
3,7-Dioxy-12-keto-cholansäure.
Apocholsäure und 3,12-Dioxycho-len(7)-säure.
7,12-Diketo-cholansäure.
Desoxy-cholsäure.
Cheno-desoxy-cholsäure.
3,12-Diketo-cholansäure.
7-Oxy-cholan-säure.
12-Keto-cholan-säure.
Lithocholsäure.

Eine von Borsche als Triacetylcholsäure bezeichnete Substanz wurde von Wieland[181]) als eine 3,7-Diacetoxy-12-oxy-cholansäure erkannt. Aus ihr läßt sich die 12-Keto-cholansäure gewinnen, indem man sie zunächst zur 3,7-Diacetoxy-12-ketocholansäure oxydiert und diese über die 12-Ketocholadiensäure durch katalytische Hydrierung in die 12-Ketosäure verwandelt. Durch partielle Verseifung kann man die 3,12-Dioxy-7-acetoxy-cholansäure erhalten, die über die 3,12-Diketo-7-acetoxy-cholansäure durch Reduktion nach Wolf-Kishner in die 7-Oxy-cholansäure übergeführt wurde.

A II n. Zusammenfassung

Der strukturelle Aufbau des Kohlenstoffskeletts des Cholesterins und der Cholansäure und ihrer Derivate kann durch die hier geschilderten Experimente als eindeutig geklärt angesehen werden. Ein weiterer Beweis für die Stellung einer Methylgruppe am C-Atom 13 wird noch unten gegeben (s. S. 91). Einer Stütze bedarf noch der Nachweis der Methylgruppe am C-Atom 10, deren Stellung nur auf Grund der geringen Veresterungsgeschwindigkeit der Säure $C_{22}H_{42}O_2$ aus Cholestenon angenommen wurde. Ein Befund von Wieland und Vocke[182]) läßt sich jedoch nur mit dieser Stellung einer Methylgruppe im Vierringskelett vereinbaren: bei der Oxydation einer Diketo-dicarbonsäure $C_{23}H_{36}O_6$ (aus Brenz-desoxy-biliansäure) wurde aus dem Reaktionsgemisch die α-



---

mittel-freien Säure 173/74°. $[\alpha]_D = +49,87°$. Methylester Prismen vom Schmp. 83/84°.

Iso-säure: Schmp. 197/98°. $[\alpha]_D = +5,92°$ (in Alkohol). Yamasahi, H. 220, 42 (1933).

181) Wieland c. s., H. 212, 269 (1932), 210, 271 (1932).

Über die Produkte, die durch Beckmann'sche Umlagerung aus den Oximen von Ketocholansäuren entstehen, s. die Originalarbeiten von Schenck in H. [45. Mitt.: H. 232, 87 (1935)].

182) H. 177, 70 (1928).

Methyl-glutar-α-carbonsäure isoliert. Diese Säure läßt sich aus keiner anderen Gruppierung des Moleküls und nur bei der 10-Stellung der Methylgruppe aus dem Skelett herausschneiden.

Diese Untersuchungen zur Konstitutionsaufklärung des Cholesterins und der Cholsäure haben die Methoden gegeben, die sich weiter zur Konstitutionsaufklärung anderer Sterine und Gallensäuren und vor allem zur Feststellung der Verwandtschaft anderer Naturstoffe mit den Sterinen verwenden lassen. Es sind im wesentlichen drei Methoden:

a) die Selendehydrierung, die aus den Stoffen mit dem Vierringskelett der Sterine den Kohlenwasserstoff $C_{18}H_{16}$, das γ-Methyl-cyclopenteno-phenanthren entstehen läßt. Beispiel: Cholesterin und Cholsäure lassen sich auf diese Weise in das gleiche Derivat umwandeln.

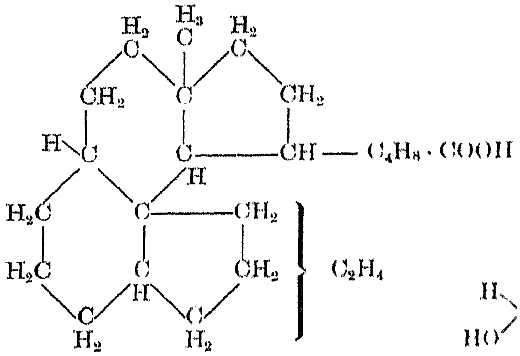
b) Der systematische oxydative Abbau der Seitenkette. Die Methode beruht darauf, den zu untersuchenden Stoff in eine Carbonsäure zu verwandeln, die das Carboxyl in der Seitenkette trägt. Die entstandene Säure wird mit den bekannten Säuren Cholan-, Nor-cholan-, Bisnor-cholan-, Aetio-cholansäure und Aetiobiliansäure, bzw. Derivaten derselben verglichen. Notwendig ist auch die Heranziehung der Säuren, die sich von dem sterischen Typus des Cholestans ableiten, also Allocholansäure, Nor-allo-cholansäure usw. Beispiel: Die Umwandlung des Koprostans in Cholansäure, Umwandlung von Hyo-desoxy-cholsäure in Allo-cholansäure.

c) Oxydative Abspaltung der Seitenkette und Isolierung des entstehenden Ketons. Beispiel: Umwandlung von Lithocholsäure und von Epi-koprosterylacetat in das gleiche Epi-3-oxy-ätio-cholanon-17.

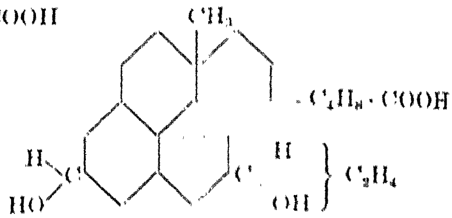
Was muß man zum Verständnis der älteren Literatur über Sterine und Gallensäuren wissen?

Die Arbeiten an den Sterinen und Gallensäuren hatte Wieland[183]) im Jahre 1928 in folgendem Strukturbild für das Grundskelett der Sterine und Gallensäuren zusammengefaßt, in dem allerdings zwei C-Atome noch nicht in befriedigender Weise untergebracht werden konnten. In ihm sind gegenüber der heute angenommenen Formel zwei wesentliche Abweichungen vorhanden: a) mit dem Ring, der im Cholesterin die Hydroxylgruppe trägt, sind in dieser Formel zwei Ringe kondensiert, und b) ist einer der benachbarten Ringe ein Fünfring. Der zweite Punkt war aus dem Verlauf der Blanc'schen Reaktion bei der Dicarbonsäure aus dem Ring mit der Doppelbindung des Cholesterins abgeleitet worden, als man die Ausnahmefälle der Blanc'schen Reaktion noch nicht kannte. Da die Tricarbonsäure, die durch Öffnung des Ringes mit der Keto-Gruppe der heutigen 12-Ketocholansäure entsteht, bei der Blanc'schen Reaktion ebenfalls nur ein Säureanhydrid lie-

[183]) Wieland, Z. f. angew. Ch. 42, 421 (1929).

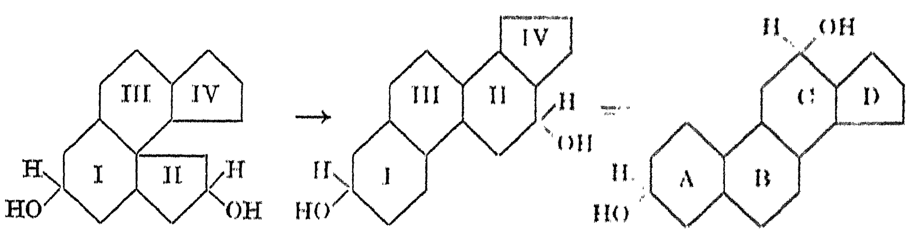


Cholansäure



Desoxy-cholsäure

fort, glaubte W i e l a n d, daß die beiden Ringe identisch seien. Außerdem ergibt sich durch einen anderen Abbau der Desoxycholsäure, daß mit dem heutigen Ring A ein hydroxylfreier Ring verknüpft ist[184]). Daraus mußte man folgern, daß der erste Ring mit zwei anderen kondensiert sei. Den Anstoß zur richtigen Deutung der Experimente gab eine Arbeit von R o s e n h e i m und K i n g[185]). Angeregt durch die Röntgenuntersuchungen, die B e r n a l[186]) an Sterinen durchgeführt hatte und die sich mit der von W i e l a n d aufgestellten Strukturformel nicht vereinbaren ließen, stellten diese Forscher eine neue Strukturformel auf, die vor allem auf der von D i e l s beobachteten Chrysenbildung bei der Dehydrierung von Sterinen oder Gallensäuren fußt. Diese Formel trug aber dem gesamten experimentellen Material noch nicht Rechnung. W i e l a n d und D a n e[187]) erkannten aber gleich, wie die alte Formulierung zu modifizieren sei, um zu dem richtigen Bild zu kommen. Man mußte die Annahme, daß der Ring mit der Ketogruppe in der Monoketo-cholansäure aus Desoxycholsäure mit dem Ring, der im Cholesterin die Doppelbindung enthält, identisch sei, eine Annahme, die nur aus Analogien abgeleitet war, fallen lassen. Mit dem ersten Ring ist nur ein Ring kondensiert. Der Ring mit der zweiten Hydroxylgruppe der Desoxycholsäure in dem alten Strukturbild mußte von dem Ring I losgelöst werden und als Sechsring zwischen Ring III und IV ein-



184) W i e l a n d c. s. H. 108, 295, 306 (1920). 110, 123 (1920). 114, 167 (1921). 134, 149 (1924).

185) R o s e n h e i m und K i n g, Journ. Soc. Chem. Ind. 51, 464 (1932).

186) B e r n a l, Nature 129, 277 (1932).

187) W i e l a n d und D a n e, H. 210, 274 (1932).

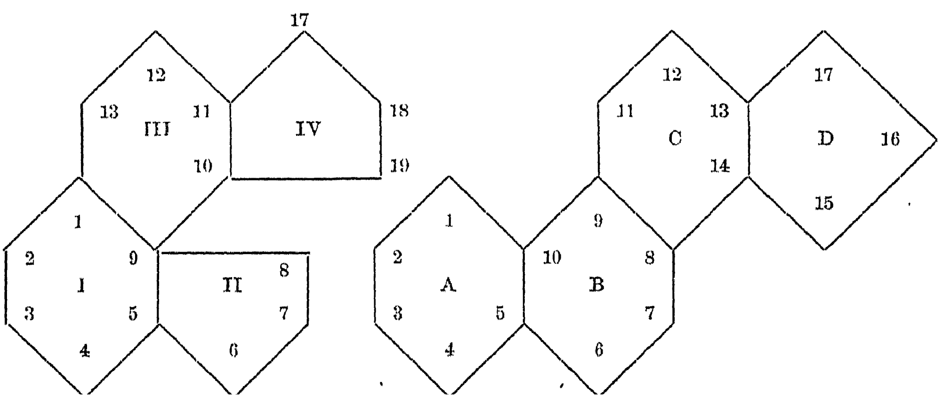
Zusammenf. s. W i n d a u s, H. 213, 147 (1932).

geschoben werden. Damit kommt man, wie aus den Formeln leicht zu ersehen ist, zu einem Gebilde, das der heute angenommenen Verknüpfung der Kohlenstoffringe entspricht.

Damit ergibt sich aber die Schwierigkeit für das Verständnis der älteren Arbeiten aus diesem Gebiet, daß gleiche Kohlenstoffringe und gleiche Kohlenstoffatome in den Sterinen und in den Gallensäuren verschiedene Bezeichnungen bekommen. Um Mißverständnisse zu vermeiden hat Wieland an Stelle der Bezifferung der Ringe durch römische Zahlen, ihre Bezeichnung mit den Buchstaben A, B, C, D vorgeschlagen. In der älteren Literatur entspricht der heutige

Ring A	dem Ring I	des Cholesterins	und dem	Ring I	der Gallensäuren.
Ring B	dem Ring II	„ „	„ „	Ring III	„ „
Ring C	dem Ring III	„ „	„ „	Ring II	„ „
Ring D	dem Ring IV	„ „	„ „	Ring IV	„ „

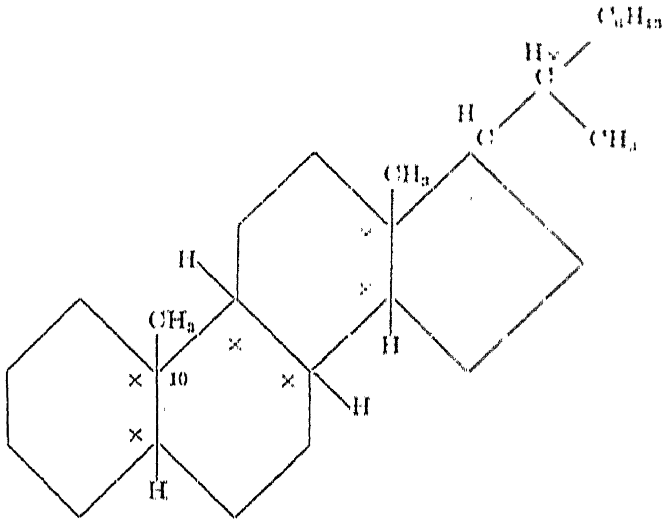
Auch die Bezifferung der Kohlenstoffatome hat eine Änderung erfahren. Die Lithocholsäure wird ebenso wie früher als eine 3-Oxycholansäure bezeichnet. In der älteren Literatur ist Desoxycholsäure als 3,7-, heute als 3,12-Dioxycholansäure, Cheno-desoxycholsäure als 3,12-, heute als 3,7-Dioxycholansäure, Hyo-desoxycholsäure als 3,13-, heute als 3,6-Dioxycholansäure bezeichnet. Die 12-Ketocholansäure wurde als 7-Ketocholansäure bezeichnet und umgekehrt die heutige 7-Keto-cholansäure als 12-Ketocholansäure. Die Cholsäure hat die gleiche Bezifferung als 3,7,12-Trioxycholansäure behalten, doch beziehen sich die gleichen Ziffern in den alten und neuen Formeln auf verschiedene C-Atome. Bei der Umänderung der Formelbilder erwies es sich als notwendig, die Hydroxylgruppe des Cholesterins, die man bis dahin am C-Atom 4 angenommen hatte, an das C-Atom 3 zu verschieben. Diese Änderung rührt also nicht von der anderen Bezifferung der C-Atome her.



A III. Die Stereochemie der Sterine und Gallensäuren

Nachdem die Struktur des Kohlenstoffskeletts der Sterine und Gallensäuren geklärt ist, erscheinen die Experimente von Interesse, die über die räumliche Lage der Substituenten an den verschiedenen Asymmetriezentren der Moleküle unterrichten. Zwar sind die hierbei auftretenden

Fragen noch nicht vollkommen sicher beantwortet, doch können wir uns heute schon ein wahrscheinlich richtiges Bild von den sterischen Verhältnissen machen. Wie man aus der angegebenen Formel sieht, enthält das Skelett des Cholestans acht asymmetrische Kohlenstoffatome. Im Cholestanol kommt durch die Hydroxylgruppe noch ein neuntes hinzu. Damit wären theoretisch 2^8 Kohlenwasserstoffe von der Struktur und der Zusammensetzung des Cholestans $C_{27}H_{48}$ denkbar, also 256 Isomere! Diese verschiedenen Isomeren lassen sich modellmäßig alle konstruieren, es fällt also keins von ihnen wegen einer zu großen Spannung des entstehenden Gebildes weg. Bei der Substitution durch eine Hydroxylgruppe erhöht sich die Zahl der Isomeren auf 512. Das Problem, das der stereochemischen Untersuchung gestellt ist, ist das folgende: Welches Isomere aus dieser großen Zahl der Möglichkeiten ist das Cholestan, das Koprostan, das Cholestanol oder das Koprosterin usw.?

(‡) 

Cholestan

Da eine absolute Festlegung der Lage der Substituenten nicht möglich ist, sondern nur eine relative Zuordnung, ist es zur Vereinheitlichung der Stereochemie der Sterine und Gallensäuren zweckmäßig, einen Substituenten als Bezugspunkt für die räumliche Zuordnung zu wählen. Hierfür erscheint die Methylgruppe am C-Atom 10 geeignet. Auf sie sollen im folgenden alle sterischen Anordnungen, soweit es bis heute möglich ist, bezogen werden, ähnlich wie man bei der Bestimmung der Konfiguration der Hexosen das Hydroxyl am C-Atom 5 der Zucker als Bezugspunkt gewählt hat[1]).

[1]) Die von Ruzicka eingeführte sterische Charakterisierung der verschiedenen Isomeren ist nicht eindeutig und sollte daher nicht weiter ver-

Die Verknüpfung der Ringe A und B im Cholestan und Koprostan

Der Ring A kann mit dem Ring B auf zweierlei Weise verknüpft sein: entweder nach Art des cis- oder des trans-Dekalins. Infolge der unsymmetrischen Substitution des Moleküls gibt es hier aber vier Kombinationsmöglichkeiten. Die Stellung der Methylgruppe an C-Atom 10 soll definitionsgemäß festgelegt sein, und zwar wird ihre Lage durch eine ausgezogene Verbindungslinie zwischen dem C-Atom 10 und der Methylgruppe gekennzeichnet. Man kann damit etwa die Vorstellung verknüpfen, daß die Methylgruppe aus der Ebene des Papieres herausrage. Alle Substituenten, die zu der Methylgruppe an C-10 cis-ständig sind, werden ebenfalls durch eine ausgezogene Verbindungslinie mit dem betreffenden C-Atom verknüpft, die trans-ständigen Substituenten sind durch eine gestrichelte Verbindungslinie charakterisiert. Zur Bestimmung der Verknüpfungsart der Ringe A und B im Cholestan und Koprostan kommt es nur darauf an, die Lage des Wasserstoffatoms an C-5 relativ zu der Methylgruppe an C-10 zu bestimmen.

Die Cholansäure leitet sich, wie oben gezeigt wurde, von dem gleichen sterischen Typus ab wie das Koprostan und das Koprosterin. Dasselbe gilt für die aus der Lithocholsäure dargestellten Tricarbonsäuren Litho- und Iso-lithobiliansäure. Andererseits entspricht dem Cholestan und Cholestanol die Allo-cholansäure, die Allo-litho-biliansäure und eine vierte Tricarbonsäure, die man in Fortsetzung dieser Bezeichnungsart als Allo-iso-litho-biliansäure bezeichnen könnte. Sie ist unter dem Namen Stadensäure in der Literatur beschrieben[2]). Sie entsteht neben der Isolithobiliansäure bei der Wolf-Kishner-Reduktion des Hydrazinkondensationsprodukts der Keto-tricarbonsäure aus β-Dehydro-hyodesoxycholsäure und läßt sich auch durch oxydative Abspaltung der Isopropylgruppe aus der Dicarbonsäure aus Cholestanol darstellen. Sie ist strukturidentisch, aber stereoisomer mit der Iso-litho-biliansäure. Windaus[3]) hat schon im Jahre 1926 aus dem verschiedenen Verhalten der vier Tri-

wendet werden. Für Cholestanol z. B., das als trans,trans,trans,trans-Derivat bezeichnet wird, würden sich acht verschiedene räumliche Formeln mit dieser Bezeichnung vereinbaren lassen, wobei das neunte Asymmetriezentrum in der Seitenkette nicht berücksichtigt ist.

[2]) Stadensäure $C_{24}H_{38}O_6$. Aus Essigsäure feine Nadeln vom Schmp. 238°. Trimethylester aus Methanol Blättchen vom Schmp. 88°. Brenz-stadensäure. Schmp. 156°. Aethylester aus Alkohol Nadeln vom Schmp. 106°. Windaus, H. 117, 153 (1921), A. 447, 252 (1926).

[3]) Windaus, A. 447, 240 (1926). Windaus, Hückel und Reverey, B. 56, 91 (1923).

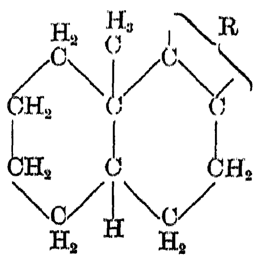
carbonsäuren bei der thermischen Cyclisierung ihre sterische Zuordnung durchführen können. Aus seinen Untersuchungen ergab sich folgendes:

1. Litho-biliansäure und Allo-lithobiliansäure geben die gleiche Brenzsäure. Eine der beiden Säuren hat sich also bei dem Ringschluß umgelagert und ist in die sterisch begünstigtere Form, in der sich ein Fünfring an einen Sechsring anschließt, übergegangen. Durch Versuche von Windaus, Hückel und Reverey ist es sehr wahrscheinlich gemacht worden, daß sich in einem solchen Fall die cis-Form ausbildet. Diejenige Tricarbonsäure, die die beiden Carboxyle aus Ring A in trans-Stellung trägt, hat sich also bei der Ringschluß-Reaktion umgelagert.

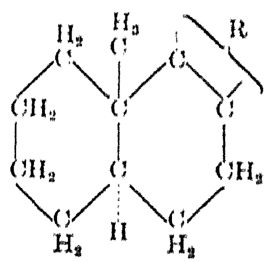
2. Iso-lithobiliansäure und Stadensäure geben zwei verschiedene Brenz-Säuren. Die ursprünglich vorhandene Anordnung der Substituenten am C-Atom 5 ist in diesem Falle erhalten geblieben, da die Carboxyle durch eine CH_2-Gruppe vom Asymmetriezentrum getrennt sind.

3. Brenz-litho-biliansäure und Brenz-isolithobiliansäure geben bei der Clemmensenreduktion die gleiche Desoxy-brenzsäure. Sie besitzen also die gleiche Anordnung der Substituenten am C-Atom 5. Nach 1 befindet sich der Fünfring in der Brenz-lithobiliansäure in cis-Stellung an den Ring B angeschlossen. Nach 2 und 3 besitzt aber dann auch die Isolithobiliansäure die gleiche cis-Konfiguration. Die sterische Anordnung der Substituenten in der Isolithobiliansäure entspricht der in der Cholansäure. Diese hat danach die gleiche Konfiguration, die des cis-Dekalins.

Damit sind Koprostan, Koprosterin und die Cholansäure als Derivate des cis-Dekalins festgelegt und entsprechend erscheinen Cholestan, Cholestanol und Allo-cholansäure als Derivate des trans-Dekalins. Die analoge Reaktionsfolge ist später auch mit den Dicarbonsäuren aus Cholestanol und Koprosterin durchgeführt worden und ergab das gleiche Resultat[4]).

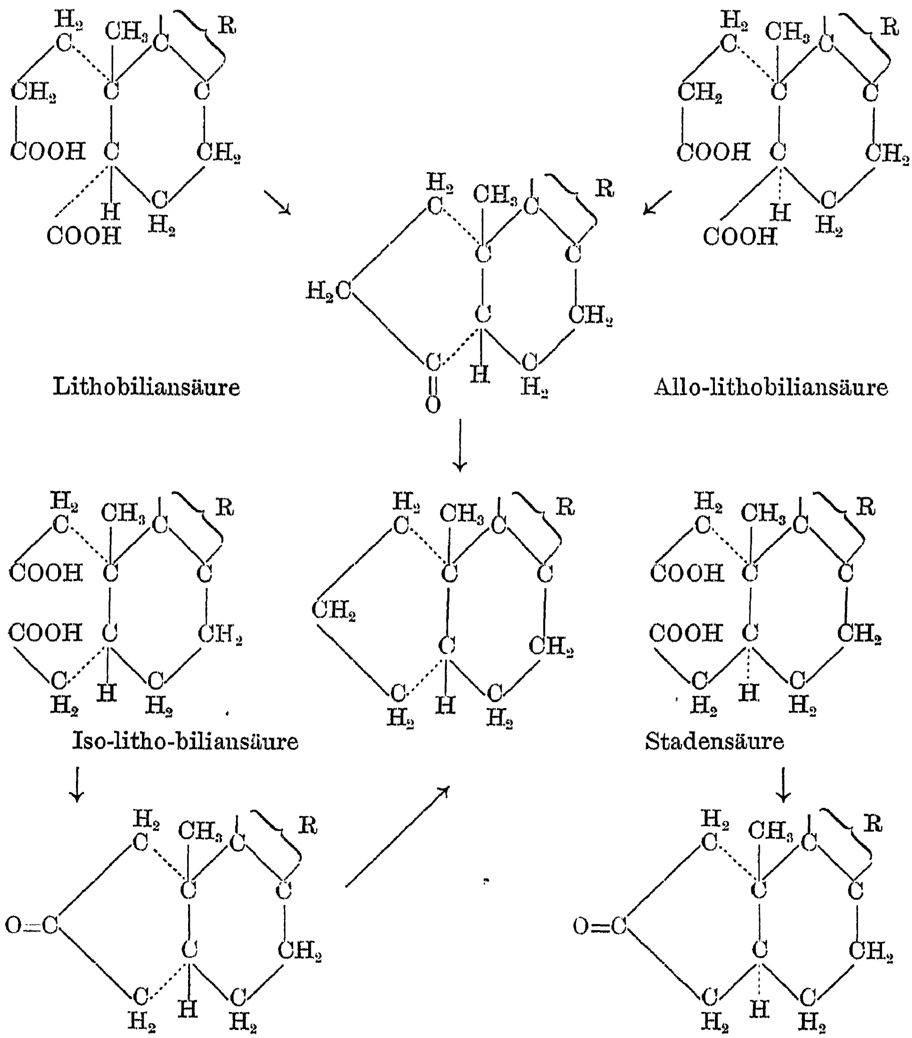


Koprostan R= $C_{16}H_{32}$
Cholansäure R= $C_{12}H_{23}COOH$



Cholestan R= $C_{16}H_{32}$
Allo-cholansäure R= $C_{12}H_{23}COOH$

[4]) Lettré, H. 221, 79 (1933).



Lithobiliansäure — Allo-lithobiliansäure — Iso-litho-biliansäure — Stadensäure

Ruzicka und Mitarbeiter[5]) haben durch Vergleich der physikalischen Konstanten des Cholestans und Koprostans mit denen des trans- und cis-Dekalins diese Ableitung sichern können. Nach Hückel[6]) besitzt das cis-Dekalin eine um 0,026 größere Dichte als das trans-Derivat. Entsprechend wurde von Ruzicka durch Messungen in dem Temperaturintervall von 80 bis 200° eine um 0,003 (± 0,0006) größere Dichte des Koprostans festgestellt. Der Absolutbetrag der Differenz ist natürlich geringer, da die Dichteänderung sich hier auf das große Molekül verteilt.

[5]) Ruzicka c. s. Helv. Ch. A. 16, 327 (1933).
[6]) Hückel, B. 57, 1639 (1924).

Auch die Molrefraktion zeigt die gleichsinnige Abweichung. Das Cholestan zeigt bei verschiedenen Temperaturen eine um 0,55 (± 0,11) größere Molrefraktion. Die Differenz der Werte für trans- und cis-Dekalin beträgt nach Hückel 0,41, nach Ruzicka 0,59[7]).

Die Tatsache, daß die α-Dehydro-hyo-desoxycholsäure, ein Cholansäure-Derivat, sich so leicht in das Allo-cholansäure-derivat, die β-Säure, umlagert, entspricht der von Hückel beobachteten Tendenz des cis-α-Dekalons in das trans-α-Dekalon überzugehen[8]).

Durch diese verschiedensten Untersuchungen, die ein übereinstimmendes Resultat ergeben, scheint die Art der Verknüpfung der Ringe A und B im Cholestan und Koprostan völlig sichergestellt. Das Wasserstoffatom an C-5 steht im Cholestan und seinen Derivaten in trans-Stellung, im Koprostan und Abkömmlingen in cis-Stellung zu der Methylgruppe an C-10.

Die Verknüpfung der Ringe B und C. Cholestan und Koprostan unterscheiden sich nur durch die verschiedene Lage des Wasserstoffatoms an C-5. An allen übrigen Asymmetriezentren stimmen sie völlig überein (Beweis: sie lassen sich beide aus dem gleichen Ausgangsmaterial, dem Pseudocholesten darstellen), so daß die im folgenden angegebenen sterischen Verknüpfungen für die beiden Stoffe und ihre Derivate gelten. Durch die verschiedene Verknüpfung von Ring B mit C könnten vier Formen entstehen, zwei cis- und zwei trans-Formen. Im Sterinskelett liegt sehr wahrscheinlich eine trans-Form vor.

Ruzicka[9]) ist durch Betrachtungen an Molekülmodellen zu der Auffassung gekommen, daß eine möglichst flache Form des Moleküls nur dann zustande kommen kann, wenn die Ringe B und C trans-verknüpft sind. Eine cis-Verknüpfung würde eine erhöhte Form des Moleküls bedingen. Da nach den Messungen von Bernal[10]) die Dimension des Sterinskeletts, senkrecht zur Ebene des Ringsystems gemessen, nur 4,5—5 Å beträgt, also dem für Paraffinkohlenwasserstoffe mit Methylseitenketten gefundenen Wert entspricht, sollte die flachste, die trans-Form vorliegen.

Wieland[11]) hatte, nachdem an den Dehydrosäuren aus Hyodesoxycholsäure die leichte Umlagerung von cis- in trans-Form gefunden

7) Ruzicka c. s. Helv. Ch. A. 14, 1174 (1931). Hückel, B. 58, 1449 (1925).

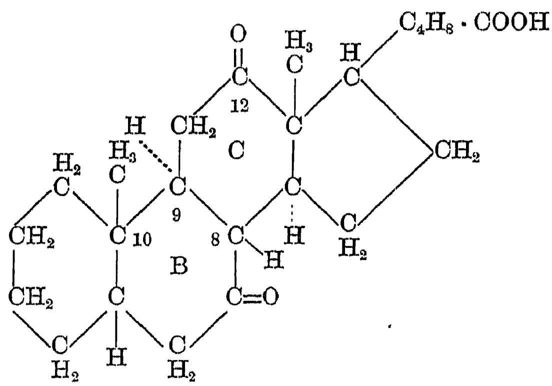
8) S. 3) und Hückel, A. 441, 1 (1925).

9) Ruzicka c. s. Helv. Ch. A. 16, 221 (1933).

10) Bernal, Nature 129, 277 (1932).

11) Wieland, H. 186, 232 (1930).

worden war, den Versuch gemacht, mit anderen Ketosäuren der Gallensäurereihe ähnliche Effekte zu erzielen. Die 7,12-Diketo-cholansäure wurde 10 Stunden mit 10prozentiger Natronlauge auf 150° erhitzt und blieb hierbei völlig unverändert. Wieland zog damals den Schluß, daß den Ketogruppen entweder keine Asymmetriezentren oder quartäre C-Atome benachbart seien und schreibt weiter: „Diese Betrachtung gilt nur unter der Voraussetzung, daß in der 7,12-Diketo-cholansäure nicht von vornherein die räumlich begünstigte Form vorliegt.“ In diesem Sinne müssen wir aber heute diesen Versuch deuten, denn in der neuen Formel befindet sich nur neben der Ketogruppe an C-12 ein quartäres C-Atom, am C-Atom 8 ist ein Wasserstoffatom vorhanden. Da nach Hückel sich das cis-α-Dekalon in das trans-Derivat umlagert und nicht umgekehrt, müssen wir annehmen, daß die Ringe B und C in der stabileren trans-Form miteinander verknüpft sind.



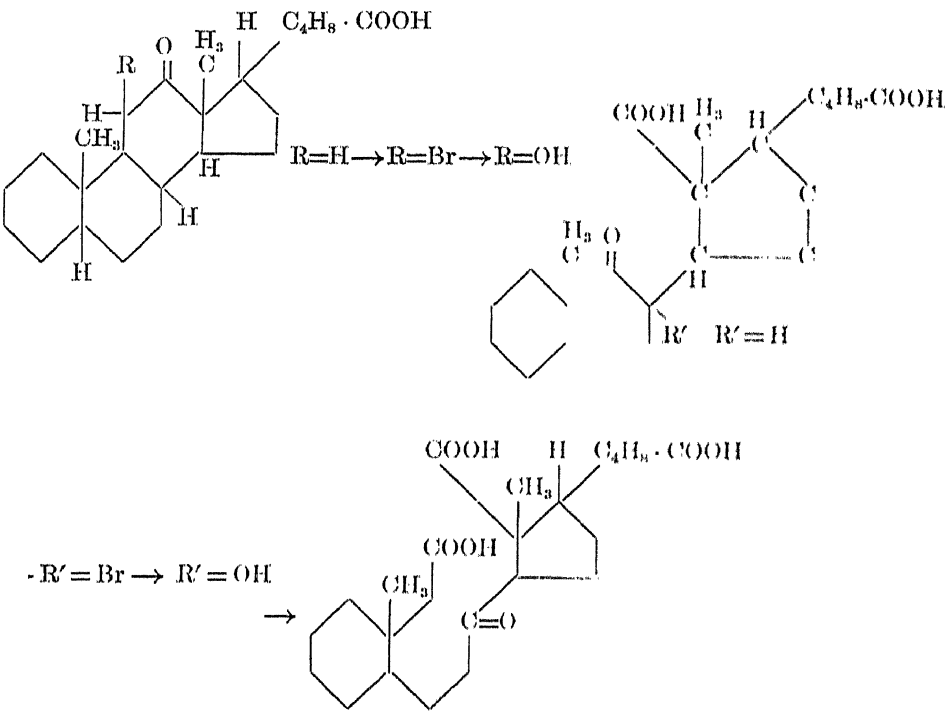
7-12-Diketo-cholansäure

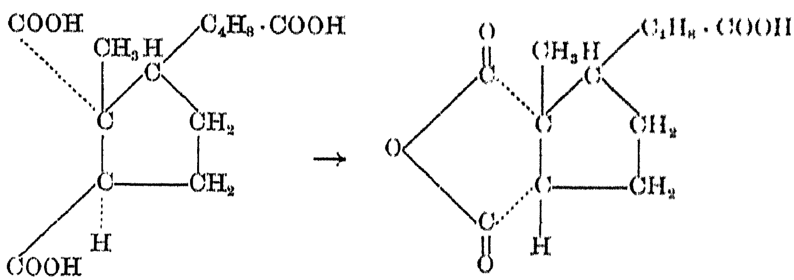
Einen Anhaltspunkt, welche der beiden möglichen trans-Formen vorliegt, hat man noch nicht. Von Ruzicka wird eine sterische Formel verwendet, in der das Wasserstoffatom an C-9 in trans-Stellung zu der Methylgruppe an C-10 steht, wie es in der Formel der Diketocholansäure angegeben ist.

Verknüpfung der Ringe C und D. Wieland und Dane[12]) konnten von der 12-Ketocholansäure aus über eine Reihe von Zwischenprodukten, die in den Formelbildern angegeben sind, eine Tricarbonsäure $C_{13}H_{20}O_6$ darstellen. In dieser ist der Ring D mit der Methylgruppe, der Seitenkette und mit zwei C-Atomen aus dem Ring C, die als Carboxyle vorliegen, aus dem gesamten Gallensäurenmolekül herausgeschält. Beim

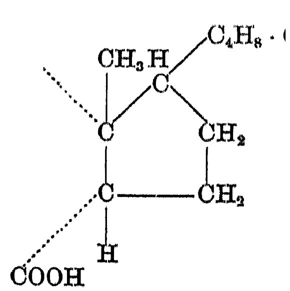
[12]) Wieland und Posternak, H. 197, 17 (1931). Wieland und Dane, H. 216, 91 (1933).

Erhitzen geht die Tricarbonsäure leicht in ihr Anhydrid über, aus dem man jedoch durch Aufspaltung des Anhydrid-Ringes nicht die Ausgangssäure, sondern eine isomere, leichter lösliche und niedriger schmelzende





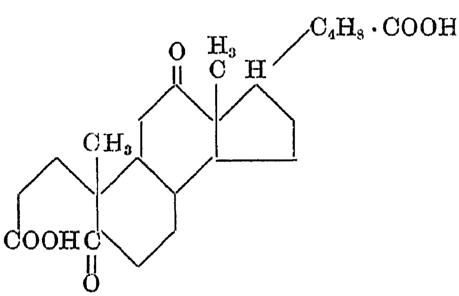
$C_{13}H_{20}O_6$,



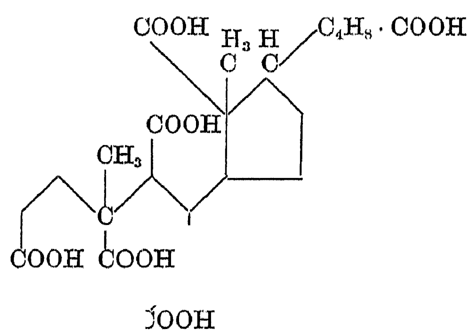
cis-Säure $C_{13}H_{20}O_6$

Tricarbonsäure bekommt. Diese Umlagerung läßt sich in Parallele zu dem Verhalten der trans-Cyclopentan-1,2-dicarbonsäure setzen[13]), die sich in das entsprechende cis-Anhydrid verwandeln läßt. Die bei der Oxydation zunächst gewonnene Tricarbonsäure sollte dann die trans-Form darstellen, die über das cis-Anhydrid in die cis-Form übergegangen ist. Da die beiden Carboxyle aus dem Ring C stammen, folgt daraus, daß die beiden Ringe C und D in trans-Stellung miteinander verknüpft sind. Die Methylgruppe an C-Atom 13 und das Wasserstoffatom an C-14 stehen in trans-Stellung zueinander. Eine direkte Beziehung zu dem Bezugspunkt Methylgruppe an C-10 läßt sich jedoch noch nicht angeben.

Aus dem Verhalten der Tricarbonsäure $C_{13}H_{20}O_6$ bei dem Übergang in das Anhydrid haben Wieland und Dane[12]) schon vor den Ergebnissen der Selendehydrierung die Stellung der Methylgruppe am C-Atom 13 beweisen können. Die gleiche Tricarbonsäure ist von Wieland und Schlichting[14]) aus der Desoxycholsäure durch oxydative Abspaltung der Ringe A und B dargestellt worden. Der Abbau führt über folgende Stufen: Desoxycholsäure wird über die Desoxybiliansäure in die Brenz-desoxy-biliansäure verwandelt, die sich durch Oxydation mit Permanganat in eine Keto-dicarbonsäure $C_{23}H_{34}O_6$ überführen läßt. Diese liefert nun bei der Oxydation mit einem Gemisch von Salpeter- und Schwefelsäure eine Tetracarbonsäure $C_{16}H_{24}O_8$. Bei der thermischen Cyclisierung geht sie in eine Keto-dicarbonsäure $C_{15}H_{22}O_5$ über, aus der man schließlich die oben beschriebene Tricarbonsäure $C_{13}H_{20}O_6$ durch Salpetersäureoxydation erhält.

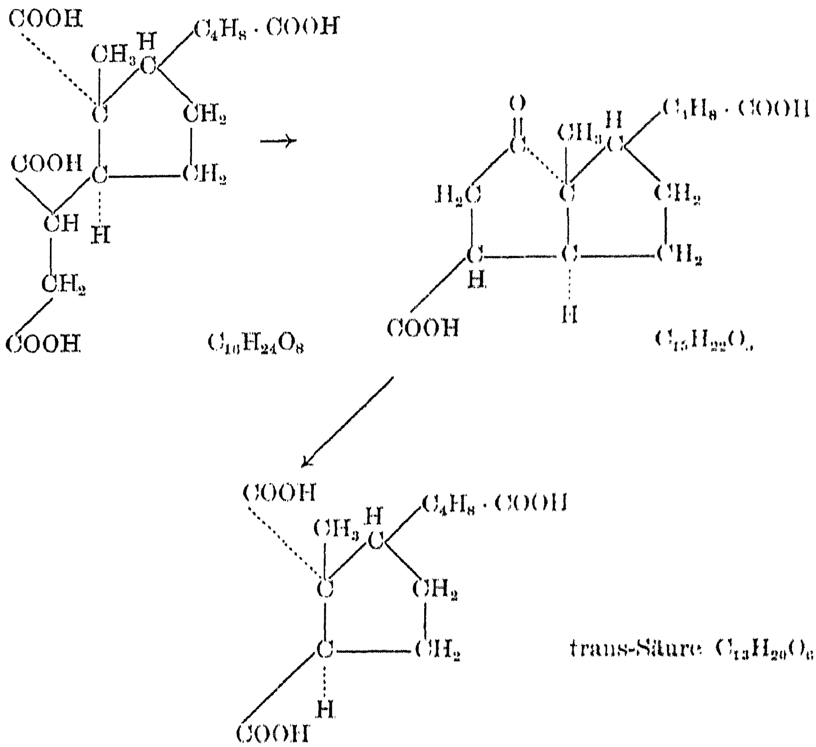


$C_{23}H_{34}O_6$



Solanellsäure
(vermutl. Zwischenprodukt)

[13]) Perkin, Soc. 65, 588 (1894).
[14]) Wieland und Schlichting, H. 134, 276 (1924).



Da die Tricarbonsäure $C_{13}H_{20}O_6$ als trans-Derivat erkannt ist, muß in der Keto-dicarbonsäure $C_{15}H_{22}O_5$ der bei der Cyclisierung neugebildete Fünfring sich ebenfalls in trans-Stellung an den Ring D anschließen. Wir haben hier ein Derivat des trans-Bicyclooctans vor uns. In einem solchen ist eine gewisse Spannung vorhanden, während die entsprechende cis-Form sich völlig spannungsfrei konstruieren läßt[15]). Wenn also die Möglichkeit einer Umlagerung der trans-Form in die cis-Form bestünde, sollte diese sich sicher ebenso leicht vollziehen, wie eine Umlagerung des trans-α-Hydrindanons in das cis-Derivat vor sich geht. Da die Umlagerung aber ausbleibt, muß der Keto-dicarbonsäure die Möglichkeit fehlen, eine Enolform zu bilden. Das Asymmetriezentrum in Nachbarschaft der Ketogruppe muß ein quartäres C-Atom sein. Die Methylgruppe steht an C-13.

trans-Tricarbonsäure $C_{13}H_{20}O_6$. Darst. auf den in [12]) und [14]) angegebenen Wegen. Aus wenig Wasser kristallisiert sie in zu Büscheln vereinigten Stäbchen, die nach vorherigem Sintern bei 187° schmelzen. Anhydrid, Darst. durch Hochvakuumdest. der Tricarbonsäure bei 200°. Das De-

[15]) Hückel, Theor. Grundl. d. org. Chemie I, 62 (1931).

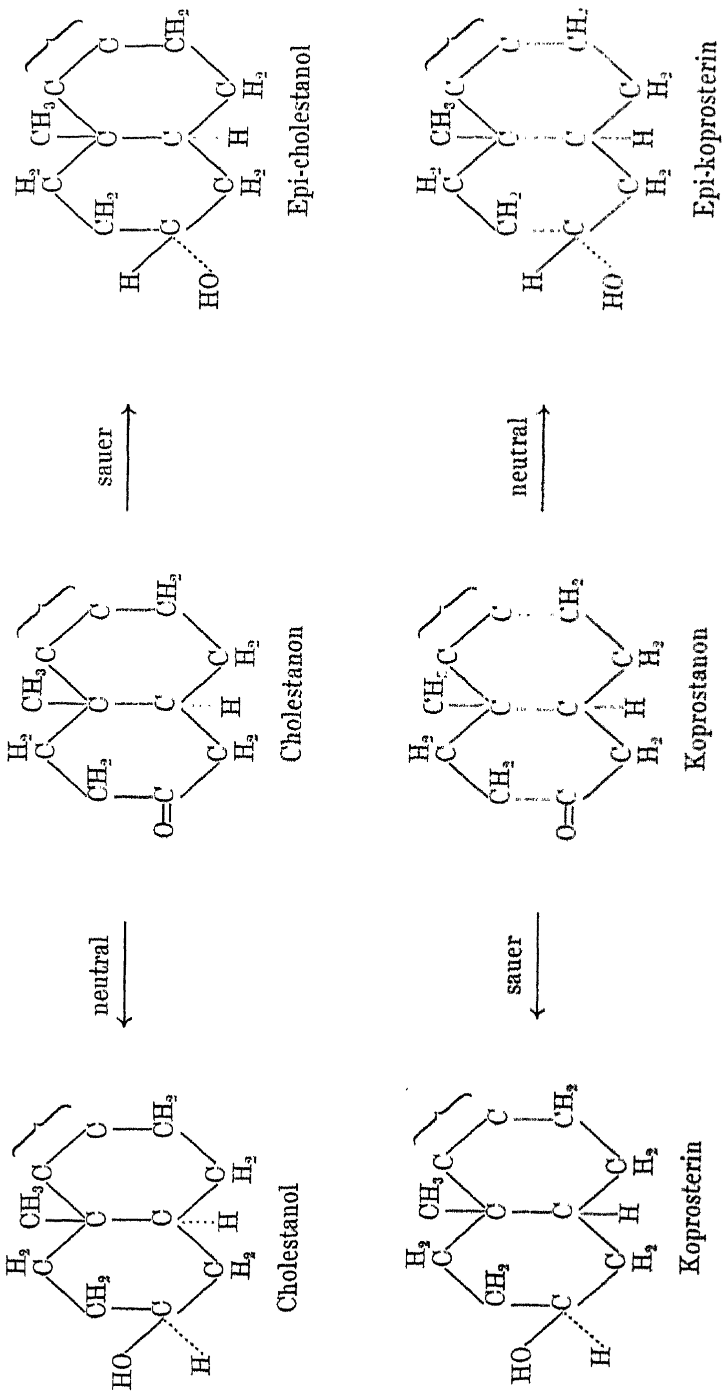
stillat wird aus Äther umkristallisiert. Prismen vom Schmelzpunkt 145/46°. cis-Tricarbonsäure. Darst. durch Erhitzen des Anhydrids mit Wasser. Leicht löslich in Wasser, aus verd. Salzsäure Prismen vom Schmp. 136°. $[\alpha]_D$ der trans-Säure = — 27,3°, der cis-Säure = + 36,4°.

Die relative Stellung der Seitenkette. Wieland und Dane[16]) glauben, daß die Bildung des Dehydro-norcholens aus der 12-Ketocholansäure nach der räumlichen Lage so am leichtesten verlaufen würde, wenn „die Seitenkette auf derselben Seite der D-Ring-Ebene anzunehmen ist, von der aus die Angliederung des Ringes C von C-12 her erfolgt. Damit käme die Seitenkette in trans-Stellung zur Methylgruppe an C-13". Durch Betrachtungen am Modell erscheint es jedoch gleichgültig, ob der neugebildete Ring im Dehydronorcholen in cis- oder trans-Stellung zu der Methylgruppe an C-13 liegt, sodaß ein anderer Beweis noch durchzuführen bleibt.

Durch diese Untersuchungen haben wir über die relative Lage der Substituenten an sieben von den acht Asymmetriezentren mehr oder minder sichere Auskunft erhalten. Es bleibt der weiteren Untersuchung überlassen, die wahrscheinlichen Annahmen zu sichern oder zu ändern. Die Festlegung der Konfiguration am achten Asymmetriezentrum in der Seitenkette dürfte wohl die größten Schwierigkeiten machen, da man hier nur auf einen optischen Vergleich angewiesen ist.

Die Lage der Hydroxylgruppe am C-Atom 3. Durch die Arbeiten von Windaus sind die vier theoretisch möglichen Derivate des Cholestans und Koprostans, die eine Hydroxylgruppe an C-Atom 3 tragen, bekannt geworden. Von den Epi-Derivaten, Epi-cholestanol und Epi-koprosterin weiß man nur, daß sie ihre Hydroxylgruppe in der räumlich entgegengesetzten Lage wie ihre Muttersubstanzen tragen. Ruzicka[17]) hat aus den Arbeiten von Vavon, Grasshof u. Ruzicka über die Hydrierung des Cholestanons und des Koprostanons in saurer oder neutraler Lösung Schlußfolgerungen gezogen, wie die Hydroxylgruppen in den verschiedenen Isomeren räumlich angeordnet sein könnten. Nach der v. Auwers-Skitaschen Hydrierungsregel sollen sich bei der katalytischen Hydrierung in saurem Medium die cis-Formen, in neutralem dagegen die trans-Formen bilden. Die Ergebnisse, die bei der Hydrierung erhalten wurden, sind in der folgenden Übersicht dargestellt:

[16]) Wieland und Dane, H. 216, 98 (1933).
[17]) Ruzicka c. s., Helv. Ch. A. 17, 1407 (1934).


Epi-cholestanol
sauer
Cholestanon
neutral
Cholestanol
Epi-koprosterin
neutral
Koprostanon
sauer
Koprosterin

Bezieht man die Anordnung der Hydroxylgruppe zunächst auf das Wasserstoffatom an C-5, so ergibt sich, daß im Cholestanol die Hydroxylgruppe in trans-Stellung, im Epi-Derivat in cis-Stellung zu diesem Substituenten steht oder, wenn wir auf die Methylgruppe an C-10 beziehen, daß im ersten Fall cis-Stellung, im zweiten trans-Stellung vorhanden ist. Entsprechend ist im Koprosterin das Hydroxyl in cis-Stellung, im Epikoprosterin in trans-Stellung zu dem Wasserstoffatom an C-5 und damit auch zu der Methylgruppe an C-10.

Cholestanol enthält die Hydroxylgruppe in der gleichen räumlichen Lage wie das Cholesterin, Cholesterin trägt seine Hydroxylgruppe an C-3 also ebenfalls in cis-Stellung zu der Methylgruppe an C-10. Durch die Umwandlung der Lithocholsäure in das gleiche 3-Oxy-aetio-cholanon-17, das man auch aus Epi-koprosterylacetat bekommt, hat Ruzicka[18]) zeigen können, daß in der Lithocholsäure die Hydroxylgruppe entgegengesetzt wie im Cholesterin und im Koprosterin steht. Das gleiche gilt auch für die Hyo-desoxycholsäure. Die von Wieland[19]) daraus dargestellte 3-Oxy-allocholansäure ist an C-3 epimer mit der aus Cholestanol gebildeten Säure der gleichen Strukturformel[20]). Bei der Umwandlung von Cholsäure und Desoxycholsäure in Lithocholsäure ist eine Umkehrung am C-Atom 3 nicht ganz sicher auszuschließen, so daß man für die sterische Lage der Hydroxylgruppe an C-3 dieser Säuren nur aus Analogie zur Lithocholsäure auch die entgegengesetzte Stellung wie im Cholesterin annehmen kann.

Über die sterische Lage der Hydroxylgruppen an C-12 der Cholsäure und an C-6 der Hyo-desoxycholsäure hat man noch keinen Anhalt. Dagegen kann man die Stellung der Hydroxylgruppe am C-Atom 7 der Cholsäure und der Cheno-desoxycholsäure festlegen. Oben wurde gezeigt, daß man die beiden Säuren in die gleiche Lactondicarbonsäure $C_{24}H_{36}O_6$ verwandeln kann. Eine Lactonbildung zwischen der Carboxylgruppe am C-Atom 5 und der Hydroxylgruppe am C-Atom 7 kann nur stattfinden, wenn die beiden Substituenten in cis-Stellung zueinander stehen. Die Carboxylgruppe steht in trans-Stellung zu der Methylgruppe an C-10, also muß sich auch die Hydroxylgruppe an C-7 in trans-Stellung zu diesem Substituenten befinden[21]).

Die Festlegung der sterischen Anordnung der Substituenten im Skelett der Sterine und Gallensäuren hat nicht nur das Interesse, der

[18]) Ruzicka c. s., Helv. Ch. A. 18, 668 (1935). S. [17]).
[19]) Wieland c. s., H. 212, 41 (1932).
[20]) Fernholz c. s., B. 67, 2021 (1934).
[21]) Lettré, B. 68, 767 (1935).

Konstitutionsaufklärung den letzten Feinschliff zu geben, sondern sie stellt eine notwendige Vorarbeit für spätere synthetische Versuche dar. Aber auch für die theoretische Forschung ergeben sich noch Fragen aus dem verschiedenen Verhalten stereoisomerer Derivate der Sterine und Gallensäuren. So macht Wieland[22]) auf die folgende Gesetzmäßigkeit aufmerksam: Die Derivate des trans-Dekalins, die eine Hydroxylgruppe am C-Atom 3 tragen, lassen sich bei der Oxydation in der Hauptrichtung zwischen C-2 und C-3 aufspalten, während die entsprechenden cis-Dekalin-Derivate zwischen C-3 und C-4 aufgesprengt werden. Für dieses verschiedene Verhalten geben uns die Strukturformeln keinerlei Erklärung. Das gleiche gilt von dem verschiedenen Verhalten einiger Derivate, die am C-Atom 3 ein Chloratom tragen. Man kennt ein α- und ein β-3-Chlor-cholestan-6-on. Das α-Derivat stellt man aus Cholesteryl-chlorid, Nitrocholesteryl-chlorid und daraus durch Reduktion mit Zink und Eisessig dar. Zur Darstellung des β-Derivats ändert man die Reihenfolge der einzelnen Reaktionen und stellt aus Nitro-cholesterin-nitrat das 3-Oxy-cholestan-6-on dar, das man in das Chlorderivat überführt. Das α-Derivat läßt sich stundenlang mit Zinkstaub und Eisessig kochen, ohne verändert zu werden. In dem β-Körper läßt sich bei der gleichen Reaktion aber glatt das Chloratom gegen Wasserstoff ersetzen. Andererseits spaltet das α-Derivat leichter Chlorwasserstoff ab: bei der Vakuumdestillation oder durch Erwärmen mit alkohol. Kali geht es in ein ungesättigtes Keton über, das β-Derivat bleibt hierbei aber völlig unverändert. Ganz analoge Unterschiede zeigen die Chlordicarbonsäuren, die man durch Aufspaltung des Ringes B aus den Chlorketonen erhält[23]).

Auch die physiologische Wirkung kann starke Abhängigkeit von der Konfiguration zeigen. Ruzicka hat die dem Koprosterin, Epikoprosterin, Cholestanol und Epi-cholestanol entsprechenden Isomeren des 3-Oxy-actio-cholanon-17 dargestellt. Das dem Epicholestanol entsprechende Derivat ist mit dem Testikel-hormon identisch und zeigt dessen ausgesprochene physiologische Wirkung. In dem Cholestanol-Derivat ist die Wirksamkeit auf rund ein Zehntel gesunken und in den Derivaten des cis-Dekalins ganz verschwunden[24]).

Das Cholestanol hat ebenso wie das Cholesterin die Fähigkeit, die hämolytische Wirkung von Saponinen, z. B. Digitonin, aufzuheben. Diese Eigenschaft fehlt dem Epi-cholestanol. Für dieses verschiedene physiolo-

[22]) Wieland, Dane und Martius, H. 215, 15 (1933).
[23]) Windaus und v. Staden, B. 54, 1059 (1921).
[24]) Ruzicka c. s., Helv. Ch. A. 17, 1395 (1934).

gische Verhalten der Stereoisomeren gibt es jedoch eine ausreichende Erklärung: es läßt sich auf die Fähigkeit bzw. Unfähigkeit der Isomeren zurückführen, mit Digitonin eine inaktive komplexe Verbindung zu bilden[25]).

A IV. Die Sterine

A IV a. Cholesterin, das Sterin der Wirbeltiere

Cholesterin ist das typische Sterin der tierischen Zelle, es ist ein primärer Zellbestandteil[1]). Neben ihm hat man nur noch seine beiden Hydrierungsprodukte, Cholestanol und Koprosterin, aufgefunden. Cholestanol ist ein ständiger Begleiter des Organ-cholesterins[2]), Koprosterin findet sich in den Faeces[3]). Das Cholesterin ist auch im Organismus die Muttersubstanz der beiden Stoffe. Bis jetzt hat man noch keine anderen Sterine im Organismus der Wirbeltiere auffinden können. Pflanzliche und Pilz-sterine finden sich nicht[4]). Über die Anwesenheit von ungesättigteren Sterinen s. S. 311. Das „Iso-cholesterin“ aus dem Wollfett der Schafe ist nach den Untersuchungen von Windaus kein echtes Sterin. Die von Lifschütz aufgefundenen Sterine Oxy-cholesterin und Metacholesterin sind weder einheitliche Substanzen noch primäre Inhaltsstoffe. Das Oxy-cholesterin entsteht nach Bischoff[5]) als Kunstprodukt durch Oxydation des Cholesterins bei der Aufarbeitung, Metacholesterin ist nach den Untersuchungen von Windaus[6]) ein unreines Cholesterin.

Das Cholesterin findet sich im Organismus in freier Form und als Fettsäureester. In einigen Organen, z. B. im Gehirn, ist nur freies Cholesterin vorhanden, während in der Haut, im Blut und in der Nebenniere neben dem freien Cholesterin auch seine Ester mit Ölsäure und anderen Fettsäuren zu finden sind. Über die Größenordnung des Gehaltes einiger Organe an Cholesterin unterrichtet die folgende Übersicht:

[25]) Windaus, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, 1916. Math. phys. Klasse 1.

[1]) Kossel, Du Bois-Reymond Arch. 1881, 181.

[2]) Schönheimer, H. 197, 73 (1930). Page und Müller, H. 204, 13 (1932).

[3]) Bondzynski und Humnicki, H. 22, 396 (1896/97).

[4]) Fraser und Gardner, Proc. Roy. Soc. 82, 559 (1910). Schönheimer, H. 180, 1 (1929).

[5]) Z. exp. Med. 70, 83 (1930).

[6]) H. 109, 183 (1920), 115, 258 (1921).

gesamtes Menschenhirn (trocken)	ca. 10	Prozent	Cholesterin	[7]
Rinde	1,15	,,	,,	
weiße Substanz	2,47	,,	,,	
Kleinhirn	ca. 1,31	,,	,,	
Brücke und verlängertes Mark	4,03	,,	,,	
Nervus ischiadicus	5,61	,,	,,	[8]
Nervengewebe	1,1	,,	,,	[9]
Nebenniere	3	,,	,,	[10]
Kaninchen, Gesamttier (feucht)	0,117	,,	,,	[11]
Hühnchen, Gesamttier (feucht)	0,527	,,	,,	[12]
Niere (feucht)	0,24	,,	,,	[13]
Muskel (trocken)	0,23	,,	,,	
Retina des Ochsen (feucht)	0,65	,,	,,	[14]
Frisches Fleisch (feucht)	0,076	,,	,,	[15]
Menschengalle (feucht)	0,06 bis 0,16	Prz.	Cholest.	[17]
Samen des Rheinlachses	2,2	Prozent	Cholesterin	[18]
Thymus (Kalb) trocken	0,53	,,	,,	[19]
Schilddrüse (Hammel), trocken	0,17	,,	,,	
Lunge (Kalb), trocken	1,09	,,	,,	
Leber (Schwein), trocken	0,54	,,	,,	
Pankreas (Kalb), trocken	4,3	,,	,,	
Milz (Kalb), trocken	1,97	,,	,,	
Niere (Hammel), trocken	0,83	,,	,,	
Nebenniere (Hammel), trocken	0,67	,,	,,	
Prostata (Stier), trocken	0,59	,,	,,	
Ovarium (Kuh), trocken	0,43	,,	,,	
Leber (Maus)	0,52 bis 0,67	Proz.	Cholest.	[20]

[7]) Fränkel, Bio. Z. 19, 254 (1909), 46, 253 (1912).
[8]) Chevalier, H. 10, 97.
[9]) Flint, Maly's Jahresbericht 28, 341.
[10]) Fourneau und Piettre, Bull. Soc. Chem. France [4] 11, 805 (1912).
[11]) Dorée, Biochem. J. 4, 101 (1909).
[12]) Ellis und Gardner, Proc. Roy. Soc. 81, 132 (1909).
[13]) Dormeyer, Arch. ges. Physiol. 65, 99 (1896).
[14]) Cahn, H. 5, 215 (1881).
[15]) Kusumoto, Bio. Z. 14, 411 (1908).
[16]) König, Chemie d. menschl. Nahrungs- und Genußmittel.
[17]) Hammarsten, Lehrb. d. physiol. Chemie. Cholesterin in den Gallen versch. Tiere s. die Literatur zu S. 140.
[18]) Miescher, B. 7, 376 (1874).
[19]) Gérard, C. 1911 I, 1886.
[20]) Schönheimer und Hummel, H. 192, 115 (1930).

Besonders reich an Cholesterin sind Lebertran und andere Fischöle[21]; im Haifischtran[22] wurden 4,4 bis 5,3% gefunden. 1 Liter Menschenblut enthält 1,67 bis 2,55 g Cholesterin[23]. Dieses verteilt sich auf freies und Ester-cholesterin, und zwar sind etwa 33,5% verestert[24].

Es enthalten feuchte rote Blutkörperchen 0,112% frei und 0,0043% Ester, feuchte weiße Blutkörperchen 0,52% frei und 0,0013% Ester[25].

Das Verhältnis von freiem Cholesterin zu seinen Estern im Serum ist bei den einzelnen Tieren verschieden, aber im normalen Organismus konstant. Bei den Säugetieren überwiegt das Ester-cholesterin über das freie Cholesterin. Das Verhältnis von freiem zu gebundenem Cholesterin ist beim Kaninchen 1 : 1,7, Hund 1 : 2,5, Kalb 1 : 2,9, Pferd 1 : 3,3[25].

Beim Katzenhai[26] konnte das entgegengesetzte Verhältnis, nämlich 1 : 0,33 festgestellt werden.

Cholesterinester finden sich auch im Wollfett der Schafe[27]. Liebreich[28] fand, daß von den epidermalen Gebilden (Haaren, Nägeln, Federn, Hufen, Hörnern) Cholesterinester ausgeschieden werden, besonders reichlich sind sie im Hautfett vorhanden.

Auffallend ist die Anreicherung an Cholesterin-estern (neben einem Gesamtanstieg von Cholesterin) in einigen pathologischen Fällen. Panzer[29] zeigte zuerst, daß die protagon-artigen doppelbrechenden Substanzen in verfetteten Organen Cholesterinester darstellen, die Windaus[30] als Oleate und Palmitate identifizieren konnte. Eine normale Niere enthält 0,103% Cholesterin und 0,032% Ester. In einer verfetteten Niere fand Windaus 0,74% Cholesterin und 1,05% Ester. Ähnliche Verhältnisse liegen bei Tumoren, Cystenflüssigkeiten und im Eiter vor[31]. In arteriosklerotischen Aorten läßt sich ebenfalls ein Anstieg von Cholesterin und seinen Estern feststellen[32]. Der Äther-extrakt von normalen

21) Weidemann, Biochem. J. 20, 685 (1927). Drummond, Biochem. J. 19, 1047 (1926).

22) Maly's Jahresbericht 23, 45.

23) Denis, J. biol. Chem. 29, 93 (1917). Hürthle, H. 21, 331 (1896).

24) Bloor und Knudson, J. biol. Chem. 29, 7 (1917).

25) Wacker und Hueck, Arch. exp. Path. Pharmakol. 74, 416 (1913), Bio. Z. 100, 88 (1919).

26) Hueck, Arch. exp. Path. Pharm. 74, 442 (1913).

27) Schulze, B. 5, 1075 (1872), 6, 251 (1873).

28) Jahresbericht üb. d. Fortschritt d. Chem. 1886, 2164.

29) H. 48, 519 (1906), 54, 239 (1907/08).

30) H. 65, 110 (1910).

31) Hoppe-Seyler, Handb. d. physiol. u. pathol. Chem. Analyse.

32) Aschoff, Verb. d. dtsch. Path. Ges. X 1906, 166. Windaus, H. 67, 174 (1910).

Aorten enthielt in einigen von Schönheimer[33]) untersuchten Fällen 25,0% freies Cholesterin und 13,8% Ester, in einer arteriosklerotischen Aorta wurden 22,55% frei und 62,8% Ester gefunden. Gallensteine können mehr als 90% (freies) Cholesterin enthalten.

Cholesterin wird im Organismus synthetisiert. Die Frage, ob das im Organismus vorhandene Cholesterin seinen Ursprung einer Synthese verdankt oder ob der Organismus auf eine Zufuhr durch die Nahrungsstoffe angewiesen ist, hat sich im ersten Sinne entscheiden lassen. Bilanzversuche an Säuglingen und an Erwachsenen führten zu dem Ergebnis, daß die Cholesterinausscheidung die Zufuhr durch die Nahrung übertrifft[34]). Beumer und Lehmann[35]) machten folgenden Versuch: Zwei Hunde wurden vier Wochen lang mit einer cholesterin-armen Kost gefüttert. Sie enthielten nach dieser Zeit doppelt soviel Cholesterin als zwei Hunde des gleichen Wurfs, die 8 Tage nach der Geburt getötet wurden, und zwar war der Cholesteringehalt 30mal größer als die mit der Nahrung aufgenommene Menge. Eine Reihe von Forschern[36]) untersuchten den Cholesteringehalt im unbebrüteten Ei und die Änderungen, die der Gehalt während der Bebrütung erfährt. Im Endeffekt ergab sich eine Steigerung des Gesamtcholesterins um ca. 10%. Gleichzeitig tritt eine Verschiebung des Verhältnisses von freiem zu verestertem Cholesterin ein; das freie Cholesterin nimmt ab, die Ester nehmen zu[37]).

Besonders überzeugend ist eine Sterinbilanz an der legenden Henne, die Schönheimer[38]) durchgeführt hat: In einer Vorperiode wurde festgestellt, daß der Gehalt der Eier an Cholesterin größer war als die Sterinzufuhr mit der Nahrung, und in einer anschließenden Hauptperiode wurde der Steringehalt der Nahrung, des ausgeschiedenen Kots und der gleichzeitig gelegten Eier untersucht. 3 Hühner legten in 8 Tagen 12 Eier, die 4,276 g Cholesterin enthielten. Mit der Nahrung wurden 3,021 g Sterin aufgenommen und im Kot 2,813 g ausgeschieden. In einem ent-

[33]) Schönheimer, H. 160, 61 (1926), 177, 142 (1928).

[34]) Gardner und Fox, Proc. Roy. Soc. B. 92, 358 (1921), 98, 76 (1925). Wacker und Beck, Berl. Klin. Ws. 18, 453 (1921). Thannhauser, Dtsch. Arch. Klin. Med. 141, 90 (1923). Beumer, Z. exper. Med. 35, 328 (1923).

[35]) Z. exper. Med. 37, 274 (1923).

[36]) Thannhauser und Schaber, H. 127, 278 (1923). Dam, Bio. Z. 194, 188 (1928). Kusui, H. 181, 101 (1929).

[37]) S. [36]) und Hanes, J. exper. Med. 16, 512 (1912). J. K. Müller, J. biol. Chem. 21, 23 (1915).

[38]) H. 185, 119 (1929).

sprechenden Versuch wurden von 3 Hühnern in 14 Tagen 20 Eier gelegt, die 7,132 g Cholesterin enthielten. Mit der Nahrung wurden 5,234 g aufgenommen und 4,653 g wieder ausgeschieden. Die Ausscheidung kommt also nahe an die Menge des Nahrungscholesterins heran; die Gesamtmenge des Cholesterins in den Eiern muß durch Synthese entstanden sein.

Neben dem im Organismus vorhandenen endogenen Cholesterin kann aber noch exogenes Cholesterin aus der Nahrung stammen. Doch rührt dieses auch nur aus der Fleischnahrung her, verdankt seinen Ursprung also auch einer Synthese im Tierkörper. Die früher angenommene Anschauung[39]), daß der tierische Organismus in der Lage sei, pflanzliche Sterine zu resorbieren und in Cholesterin umzuwandeln, hat sich durch die Untersuchungen von Schönheimer[40]) als irrig erwiesen. Die Pflanzensterine werden vom Magendarmkanal aus gar nicht resorbiert[41]) (auch beim Pflanzenfresser), sie verlassen den Körper unverändert wieder[42]). Auch die Resorption des Ergosterins erreicht keine nennenswerten Beträge, obschon sie in einigen Fällen nachgewiesen werden konnte[43]). Sitosterin[44]), das im Unterhautbindegewebe deponiert wurde, wird nicht wie Cholesterin verestert und nutzbar gemacht, sondern wie ein Fremdkörper, wie Kohlenstaub, behandelt und zu den regionalen Lymphdrüsen abgeschleppt. Von allen Sterinen ist nur das Cholesterin leicht resorbierbar[45]), und zwar wird diese Resorption durch gleichzeitige Gabe von Fetten und von gallensauren Salzen (s. S. 146) sehr begünstigt[46]). Das Nahrungscholesterin wird vom Duoden aus resorbiert und von dort ebenso wie Fette über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf übergeführt, ein anderer Weg führt über die Pfortader zur Leber[47]). Mueller[48]) konnte zeigen, daß das Cholesterin bei

[39]) Fraser und Gardner, Proc. Roy. Soc. B. 82, 559 (1910).

[40]) H. 180, 1 (1929).

[41]) Über eine Sitosterin-resorption bei der Ratte s. die Arbeiten von Beumer und Fasold, Bio. Z. 259, 471 (1933), und Dam und Starup, Bio. Z. 274, 117 (1934).

[42]) H. 180, 32 (1929). Windaus, Arch. d. Pharm. 246, 121 (1908).

[43]) Schönheimer c. s., H. 208, 77 (1932), 211, 241 (1932). Menschick und Page, H. 211, 246 (1932).

[44]) H. 180, 19 (1929).

[45]) Schönheimer c. s., H. 192, 117 (1930).

[46]) Schönheimer, Bio. Z. 147, 258 (1924). Löffler, H. 178, 186 (1928). Hummel, H. 185, 105 (1929). Leites, Bio. Z. 184, 273, 300 (1927).

[47]) Nedwedski, Pflügers Arch. 214, 337 (1926). Mueller, J. biol. Chem. 22, 1 (1916).

[48]) S. [47]) Veresterung s. a. Thannhauser und Schaber, Klin. Ws. 5, 252 (1926). Nedwedski, H. 236, 69 (1935).

der Resorption teilweise in Ester übergeführt wird, die später wieder zerlegt werden.

Das mit der Nahrung aufgenommene Cholesterin wird vom Organismus ebenso wie das endogene Cholesterin verwertet. Man beobachtet einen Anstieg der Cholesterinmenge im Blut[49]), bei erhöhten Gaben von Cholesterin kommt es zu Ablagerungen in Organen[50]). Dam[51]) konnte feststellen, daß durch Zufuhr von Cholesterin an Hühner eine Steigerung des Gehaltes in den Eiern zu beobachten war. Eine analoge Untersuchung über den Cholesteringehalt der Milch der Ziege verlief jedoch negativ[52]). Ob und wie die Synthese im Organismus durch das Nahrungscholesterin beeinflußt wird, und ob der Organismus überhaupt auf die exogene Zufuhr angewiesen ist, ist nicht sicher bekannt. Durchschnittlich nimmt man täglich in einer fettarmen Kost 0,04—0,11 g, in gemischter Kost 0,20—0,36 g und in einer fettreichen Kost bis zu 1,4 g Cholesterin zu sich[53]). Im Hungerzustand mobilisiert der Organismus seine Cholesterindepots und verwertet das durch Zellzerfall freiwerdende Cholesterin wieder, sodaß zunächst der normale Cholesteringehalt beibehalten wird[54]). Bei längerer fett- und lipoidarmer Kost (Kriegsernährung) konnte jedoch ein starkes Absinken des Cholesteringehaltes festgestellt werden[55]). Das Beispiel des konsequenten Rohköstlers spricht für eine Unabhängigkeit vom Nahrungscholesterin. Eine Untersuchung des Cholesterinstoffwechsels seines Antagonisten, des von der cholesterinreichen Trannahrung lebenden Eskimos, könnte vielleicht weitere Aufschlüsse geben[56]).

Als Ort der Synthese hat man Leber, Milz und Nebennierenrinde angesprochen, doch ist eine endgültige Beantwortung dieser Frage noch nicht erfolgt. Ein besonders reichliches Vorkommen in diesen Organen kann auch durch eine Speicherung erklärt werden[57]).

Auch die Frage, aus welchen Ausgangsstoffen der Organismus die

[49]) Schönheimer, Bio. Z. 147, 258 (1924). Gardner und Gainsborough, Biochem. J. 22, 1048 (1928).

[50]) S.[49]) und Horiye, Bio. Z. 202, 403 (1928). Ellis und Gardner, Proc. Roy. Soc. B. 84, 461 (1912).

[51]) Bio. Z. 194, 193 (1928).

[52]) Dam, H. 224, 127 (1934).

[53]) Hueck, Verh. dtsch. Path. Ges. XX, 1925, 18.

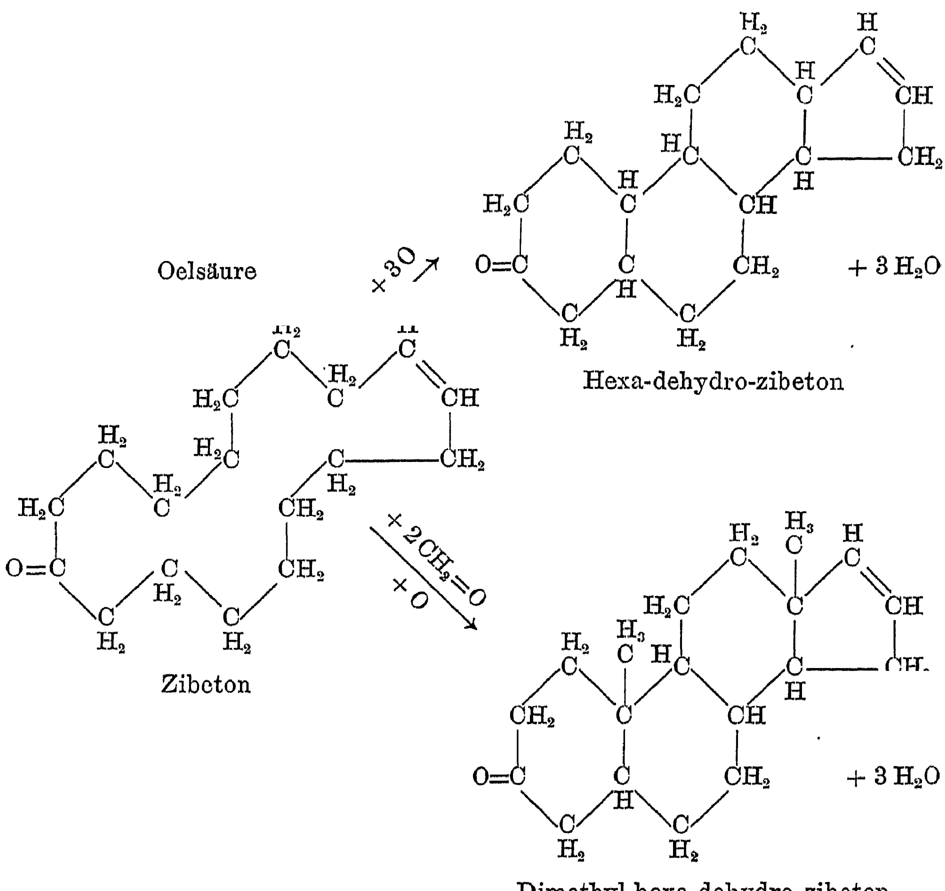
[54]) Dorée und Gardner, Proc. Roy. Soc. B. 81, 109 (1909).

[55]) Rosenthal, Berl. Klin. Ws. 56, 793 (1919).

[56]) Privatmitteilung von H. Thiersch, Freiburg.

[57]) s. Leupold, Handb. d. norm. u. path. Physiologie, V. Bd. 1928, 1095.

Cholesterinsynthese durchführt, ist nicht einfach zu beantworten. Sowohl nach Zufuhr von Eiweiß, Fett und von Kohlenhydraten ließ sich eine Steigerung des Cholesteringehaltes feststellen, doch scheint die Tatsache, daß der Cholesteringehalt der Organe parallel mit dem Fettgehalt ansteigt, für eine nebeneinanderlaufende Bildung aus der gemeinsamen Quelle der Kohlenhydrate zu sprechen[58]). Rosenheim nimmt eine direkte Umwandlung von Kohlenhydraten in Sterine an[59]). Eine von Windaus[60]) geäußerte Hypothese setzt die Ölsäure als Muttersubstanz des Cholesterins an und gibt damit eine Erklärung für die Beobachtung, daß nach Ölsäurezufuhr eine Steigerung an Cholesterin eintritt[61]). Die durch ω-Oxydation aus Ölsäure gebildete Dicarbonsäure geht in Zibeton



[58]) Knauer, H. 176, 151 (1928).
[59]) J. Soc. Chem. Ind. 51, 464 (1932).
[60]) Zit. nach der Vorlesung über Sterine S. S. 1933.
[61]) C. 1934 II, 3785. Leites, Bio. Z. 184, 273 (1927).

über, aus dem sich weiter durch innermolekulare Dehydrierung das charakteristische Vierringskelett des Cyclo-penteno-perhydro-phenanthrens bildet. Nimmt man noch die Möglichkeit einer „aufbauenden Dehydrierung" durch Formaldehyd zu Hilfe, so läßt sich damit auch das Eintreten der quartär gebundenen Methylgruppen erklären. An die Doppelbindung des so entstandenen Dimethyl-hexa-dehydro-zibetons könnte sich die Seitenkette als selbständiger Baustein addieren.

Es wäre eine sehr lohnende Aufgabe, zu untersuchen, ob sich vielgliedrige Ringe in vitro zu kondensierten Ringsystemen dehydrieren lassen, um so diese Hypothese zu stützen, die auch auf die Biogenese aller anderen natürlich vorkommenden Derivate des Cyclo-pentano-perhydrophenanthrens angewendet werden kann. Die in der Terpen- und Polyterpenreihe so fruchtbare Isoprenhypothese kann bei den Sterinen keine Anwendung finden. Weder das Vierringskelett noch die Seitenkette der verschiedenen Sterine (s. u. Stigmasterin, Ergosterin) lassen sich aus den Fünfereinheiten des Isoprens aufbauen. Von Robinson[62]) wird der Anstieg des Cholesteringehalts nach Squalenfütterung[63]) in Zusammenhang mit der biogenetischen Bildung des Cholesterins gebracht.

Schicksal und Funktion des Cholesterins im Organismus

Als Ausscheidungsweg des Cholesterins kommt einmal die Galle in Frage. Im Durchschnitt werden 0,075 bis 0,23 g in 24 Stunden ausgeschieden und in den Darm übergeführt[64]). Von hier aus kann das Cholesterin erneut resorbiert werden, so daß also ein Cholesterinkreislauf Darm—Leber—Galle—Darm existiert[65]). Zum Teil wird das Cholesterin auch ausgeschieden. Neben diesem Weg muß aber noch eine andere Möglichkeit der Ausscheidung in den Darm bestehen, denn auch bei Tieren mit

[62]) Robinson, J. Soc. Chem. Ind. 53, 1062 (1934). Squalen neben Cholesterin: in Ovarialdermoiden Dimter, H. 208, 61 (1932), im Leberfett des Hais: André und Canal, C. 1927 I, 3013, 1929 II, 2059. Thannhauser, H. 187, 173 (1930).

[63]) Channon, Biochem. J. 20, 400 (1926).

[64]) Bacmeister, Bio. Z. 26, 223 (1910).

[65]) Glykocholsäure, Cholsäure, Desoxycholsäure und Apocholsäure beschleunigen die Resorption des Cholesterins und seine Ablagerung in der Leber, also den ersten Teil dieses Kreislaufs. Die Ausscheidung aus der Leber wird nach den Untersuchungen von Hummel (H. 185, 108) nur durch die Dehydrocholsäure (Decholin) begünstigt.

Gallenfistel war in den Faeces Cholesterin zu finden[66]). Bürger und Oeter[67]) konnten feststellen, daß diese direkte Ausscheidung des Cholesterins im Dickdarm erfolgt.

Im Harn finden sich nur sehr geringe Mengen Cholesterin, so daß die Niere nicht als weiteres Ausscheidungsorgan in Frage kommt[68]). Durch die Haut werden hingegen größere Mengen ausgeschieden, etwa 0,108 bis 0,216 g pro Tag[69]). Liebreich[70]) vertritt die Ansicht, daß mit dieser Ausscheidung zugleich eine Funktion des Cholesterins für den Organismus erfüllt wird, da die ausgeschiedenen Cholesterin-ester, die gegen Mikroorganismen sehr widerstandsfähig sind, einen Schutz für die äußere Haut darstellen. Im Fett der äußeren Haut fand Eckstein[71]) 24% Cholesterin, während im subcutanen Fettgewebe nur 0,24% anzutreffen waren.

Die wichtigsten Funktionen scheint das Cholesterin im Blut zu besitzen. Eine Reihe von Toxinen wirken bei Anwesenheit von Lecithin lösend auf die roten Blutkörperchen. Das Cholesterin besitzt nun die merkwürdige Fähigkeit, die Blutkörperchen vor der Einwirkung dieser Hämolysine zu schützen. Diese Schutzwirkung ist sehr spezifisch und Pribram[72]) kommt aus diesen Beobachtungen zu der Ansicht, daß dem Cholesterin eine entgiftende Wirkung zukomme und daß es den Organismus vor der Wirkung endogener und exogener hämolytisch wirkender Stoffe schütze. Der Mechanismus dieser Schutzwirkung ist in zwei verschiedenen Arten anzunehmen: Der gesunde Organismus sucht im Blut stets ein konstantes Verhältnis von Lecithin zu Cholesterin aufrecht zu erhalten[73]). Das Lecithin erleichtert auf Grund seiner Kapillaraktivität die Resorption in den Zellen. Das Cholesterin besitzt nun eine antagonistische Wirkung, es reguliert die Resorptionssteigerung durch das Lecithin. Durch Adsorptionsverdrängung vermag es die Resorption hämolysierender Stoffe zu vermindern oder ganz aufzuheben und so die

[66]) Sperry, J. biol. Chem. 68, 357 (1925), 71, 351 (1927). Beumer und Hepner, Z. exp. Med. 64, 78 (1929). Bürger und Winterseel, H. 181, 255 (1929).

[67]) H. 182, 141 (1929), 184, 257 (1929).

[68]) Gardner und Gainsborough, Biochem. J. 19, 667 (1925).

[69]) Hueck, Verh. dtsch. Path. Ges. XX. 1925, 18.

[70]) Jahresber. d. Fortschr. d. Chemie 1886, 2164.

[71]) J. biol. Chem. 64, 797 (1926), 69, 181 (1926), 73, 363 (1927).

[72]) Pribram, Bio. Z. 1, 414.

[73]) Bloor, J. biol. Chem. 25, 577 (1916). Wacker und Hueck, Bio. Z. 100, 84 (1919).

Hämolyse zu vermeiden[74]). Von dieser Wirkungsweise verschieden ist die Entgiftung der hämolytisch wirkenden neutralen Saponine[75]). Wie Windaus[76]) fand, bilden sich in diesen Fällen definierte, stöchiometrisch zusammengesetzte Komplexverbindungen aus den Saponinen und Cholesterin, in denen die Giftwirkung aufgehoben ist. Anstelle des Cholesterins können in diesem Falle auch Pflanzen- und Pilzsterine treten[77]).

Das in den Faeces ausgeschiedene Cholesterin enthält neben Koprosterin einige Prozente Dihydrocholesterin[78]). Da Dihydrocholesterin nicht resorbierbar ist, also nicht aus der Nahrung stammen kann, haben wir in ihm ein intermediäres Umwandlungsprodukt des Cholesterins vor uns. Seine Anreicherung im ausgeschiedenen Cholesterin ist ebenfalls durch die mangelnde Resorbierbarkeit zu erklären; das begleitende Cholesterin wird erneut im Darm resorbiert. Auf diese Weise erklärt sich der Befund von Böhm[79]), der in einer 14 Jahre alten abgeschlossenen Darmschlinge reines Dihydrocholesterin finden konnte. Schönheimer[78]) konnte diese Verhältnisse auch künstlich durch Abschließung des Dickdarms konstruieren und diesen Befund bestätigen. Das Koprosterin in den Faeces verdankt seinen Ursprung Fäulnisprozessen im Darm[80]). Durch Gabe cholesterinreicher Nahrung läßt sich die ausgeschiedene Koprosterinmenge erhöhen[81]), bei Milchkost, bei der die Fäulnisprozesse im Darm zurücktreten, wird das Cholesterin unverändert ausgeschieden[82]). Außerhalb des Darmes hat sich diese bakterielle Hydrierung des Cholesterins nicht durchführen lassen. Auch Allocholesterin, das in vitro in Koprosterin übergehen kann, wird durch Fäulnis außerhalb des Darmes nicht in Koprosterin verwandelt[83]). In einer kürzlich erschienenen Arbeit konnte Schönheimer[84]) zeigen, daß Cholestenon, das durch katalytische Hydrierung leicht in Kopro-

[74]) Brinkmann und van Dam, Bio. Z. 108, 35, 61 (1920).

[75]) Ransom, Dtsch. med. Ws. 1901, 194.

[76]) B. 42, 238 (1909).

[77]) Zur Abhängigkeit der Komplexbildung Saponin-Sterinderivate s. Fernholz, H. 232, 97 (1935).

[78]) Schönheimer, H. 192, 73 u. f. (1930).

[79]) Bio. Z. 33, 474 (1911).

[80]) Bondzynski und Humnicki, H. 22, 396 (1896).

[81]) Dorée und Gardner, Proc. Roy. Soc. B. 80, 227 (1908).

[82]) Müller, H. 29, 129 (1900). Schönheimer, H. 192, 74 (1930). Beumer und Bischoff, Bio. Z. 222, 211 (1930).

[83]) Beumer und Bischoff, Bio. Z. 220, 154 (1930).

[84]) Schönheimer, Rittenberg und Graff, J. biol. Chem. 111, 183 (1935).

sterin übergeht, wahrscheinlich auch im Organismus ein Zwischenprodukt dieser Umwandlung Cholesterin—Koprosterin ist. Bei einem mit Fleischkost gefütterten Hund ging das mit der Nahrung zugeführte Cholestenon in Koprosterin über, bei einem fleischfrei ernährten Hund wurde es in Cholesterin verwandelt.

Die Umwandlung Cholesterin—Cholestanol ist die einzige sicher nachgewiesene Reaktion des Cholesterins innerhalb des Organismus. Welche Rolle diese Hydrierung des Cholesterins spielt und welche Substanzen als Wasserstoffspender fungieren, ist unbekannt. Der nach dem chemischen Aufbau naheliegende Übergang Cholesterin-Gallensäuren konnte nicht sicher erwiesen werden (s. S. 148). Nach Schönheimer[85]) findet (bei der Maus) bei großem Cholesterinangebot ein teilweiser Abbau statt, der unter normalen Bedingungen ausbleibt. Es scheint also, daß das Cholesterin, dieser im Organismus so verbreitete Stoff, nicht oder zum mindesten nicht nennenswert am Energiestoffwechsel beteiligt ist.

Eine andere Funktion des Cholesterins ist noch in einer entgiftenden Wirkung auf freie Fettsäuren zu suchen[86]). Nach Bloor[87]) dienen die Cholesterinester weiter dem Transport der Fettsäuren. Eine Hypothese von Sobotka[88]) bringt diese Funktion in Beziehung zu den konstanten Verhältnissen Cholesterin—Lecithin und Cholesterin—Cholesterinester und sieht in den Cholesterinestern die Transportform der dritten Fettsäure des Neutralfetts, während im Lecithin die übrigen Bestandteile enthalten sind.

Es soll sich eine umkehrbare Reaktion

$$\text{Lecithin} + \text{Cholesterinester} \rightleftharpoons \text{Neutralfett} + \text{Cholin} + \text{Phosphorsäure} + \text{Cholesterin}$$

abspielen. Diese Hypothese trägt auch der Konstanz des Verhältnisses Cholesterin zu Gesamtfettsäuren Rechnung[89]). Einige pathologische Fälle, sog. Lipoidosen, lassen sich als eine Störung des Ablaufs dieser Reaktion deuten.

Mannigfache Untersuchungen existieren über den Cholesteringehalt des Blutes bei Erkrankungen. Denis[90]) kommt in umfangreichen Unter-

[85]) Schönheimer und Breusch, J. biol. Chem. 103, 439 (1933). S. a. Page und Menschick, J. biol. Chem. 97, 359 (1932), H. 218, 95 (1933).

[86]) Wacker, H. 80, 383 (1912).

[87]) J. biol. Chem. 49, 201 (1921).

[88]) Naturw. 18, 619 (1930).

[89]) Mayer und Schaeffer, C. 1913 I, 1441.

[90]) J. biol. Chem. 29, 93 (1917).

suchungen zu dem Ergebnis, daß dem Cholesteringehalt vorläufig noch keine Bedeutung als Hilfsmittel zur Diagnose oder Prognose zukommt.

Nachdem Aschoff[91]) zuerst auf die Rolle der Cholesterinester bei der Atherosklerose aufmerksam gemacht hatte, gelang es durch Zufuhr größerer Cholesterinmengen in Organen Cholesterinablagerungen zu erzeugen, die der menschlichen Atherosklerose ganz analog zu sein scheinen[92]). Die Beeinflussung und Behebung dieser experimentellen Atherosklerose im Hinblick auf eine Therapie der menschlichen Atherosklerose ist Gegenstand einer Reihe von Untersuchungen, doch ist ein Abschluß noch nicht erreicht.

A IV b. Sterine niederer Tiere

Auch in niederen Tieren ist das Cholesterin aufgefunden worden, so wurde es in verschiedenen Mollusken, Arthropoden, Würmern und Anthozoen nachgewiesen[93]). Es wurde aus der Weinbergschnecke[94]), der Miesmuschel[95]), dem Maikäfer[96]), der Qualle[97]) (Velella spirans) und sogar aus Protozoen[98]) isoliert. Doch sind neben ihm noch andere Sterine vorhanden, von denen sich einige in ihrem Aufbau schon den pflanzlichen Sterinen nähern.

Aus dem Ei[99]) und dem Öl[100]) der Seidenraupe (Bombyx mori) ist außer Cholesterin noch ein zweites Sterin gewonnen worden, das man zunächst als eine einheitliche Substanz ansah und das als Bombicesterin bezeichnet wurde. W. Bergmann[101]) konnte vor kurzer Zeit zeigen, daß es sich in diesem Sterin um ein Gemisch von etwa 85% Cholesterin und 15% Sitosterin handelt. Dieser Befund wirft eine grundsätzliche Frage auf: kann die Seidenraupe selbst Sitosterin synthetisieren, oder hat sie gegenüber den höheren Tieren einen derartig veränderten Resorptionsmechanismus, der ihr gestattet, auch Pflanzen-

[91]) Verh. dtsch. Path. Ges. X 1906, 166. Ziegl. Beitr. 47, 1 (1910).

[92]) Anitschkow, Beitr. path. Anat. 56, 379 (1913), 57, 201 (1913). Versé, Beitr. path. Anat. 52, 1 (1912). Wacker und Hueck, Münch. med. Ws. 1913. Yuasa, Ziegl. Beitr. 80, 570 (1928).

[93]) Dorée, Biochem. J. 4, 72 (1909). Welsch, Diss. Freiburg i. Br. 1909.

[94]) Leulier und Charnot, C. r. Soc. Biol. Paris 94, 63 (1926).

[95]) Daniel und Doran, Biochem. J. 20, 676 (1927).

[96]) Ackermann, C. 1920 III, 493.

[97]) Haurowitz und Waelsch, H. 161, 300 (1927).

[98]) Panzer, H. 73, 109 (1911), 86, 33 (1913).

[99]) Ongoro, C. 1934 I, 2773.

[100]) Menozzi und Moreschi, C. 1908 I, 1377, C. 1910 I, 1494.

[101]) J. biol. Chem. 107, 527 (1934).

sterine aufzunehmen? Bilanzversuche könnten entscheiden, ob hier endogenes Cholesterin neben exogenem Sitosterin vorhanden ist.

Daß bei niedriger organisierten Tieren Sterine zu finden sind, die in ihrem Aufbau den pflanzlichen Sterinen entsprechen, konnte W. Bergmann[102]) am Sterin der Auster, dem Ostreasterin, zeigen. Durch katalytische Hydrierung ließ es sich in Sitostanol verwandeln, den gleichen Stoff, den man auch aus dem typischen Pflanzensterin Sitosterin erhält. Klenk und Diebold[103]) isolierten aus dem Fett von Seeanemonen (Anemonia sulcata) ein Sterin von der Zusammensetzung $C_{27}H_{44}O$, das sie Actinia-sterin nennen. Dieses Sterin ist ebenso wie das Ostreasterin doppelt ungesättigt. Die Forscher vertreten daher die Ansicht, daß es sich in beiden Fällen um Dehydrierungsprodukte der Nahrungssterine Sitosterin (bei der Auster) und Cholesterin (bei der fleischfressenden Seeanemone) handele. Auch nach diesen Ergebnissen besteht wohl kein Grund, die strenge Einteilung in tierische und pflanzliche Sterine fallen zu lassen. Cholesterin ist das typische Sterin der Wirbeltiere, bei ihnen finden sich keine Phytosterine. Bei den niederen Tieren verwischt sich jedoch die scharfe Trennung, sei es, daß hier die Synthese im Organismus andere Wege geht oder daß eine besonders starke Beeinflussung durch die Nahrungssterine zutage tritt.

Aus verschiedenen Schwämmen sind einige Sterine isoliert worden, deren genauere Untersuchung jedoch noch aussteht. So wurde aus Suberites domuncula das Spongosterin[104]), aus Cliona celata das Clionasterin[105]) und aus Microciona prolifera das Microcionasterin[106]) gewonnen.

Ostreasterin $C_{29}H_{48}O$: Aus Ostrea virginia, auch aus der Venusmuschel, der Muschel Modiola und aus zwei Gastropoden (neben Cholesterin). Aus Methanol Nadeln vom Schmp. 142/43°. $[\alpha]_D = -43{,}6°$ (Chloroform). Acetat Schmp. 134,5°. Propionat Schmp. 113/14°. Benzoat Schmp. 147°, klar bei 152°. Enthält zwei Doppelbindungen. Acetat-tetrabromid, aus Aceton Nadeln vom Schmp. 150,5°. Durch katalytische Hydrierung entsteht Tetrahydro-ostreasterin = Sitostanol. Aus den Mutterlaugen des Ostreasterylacetats: Ostreasteryl-II-acetat, Schmp. 104/05°. Ostreasterin II: Platten aus Alkohol, Schmp. 121/22°.

Actiniasterin $C_{27}H_{44}O$: Schmp. 145/46° $[\alpha]_D = -42{,}5°$. Acetat Schmp. 126/26,5°. Tetrahydro-actiniasterin Schmp. 139/40°. Acetat Schmp. 120° (unscharf).

102) J. biol. Chem. 104, 317, 553 (1934).
103) H. 236, 141 (1935).
104) Henze, H. 41, 109 (1903), 55, 427 (1908).
105) Dorée, Biochem J. 4, 92 (1909).
106) W. Bergmann und Johnson, H. 222, 220 (1933).

S p o n g o s t e r i n $C_{27}H_{48}O$: Blättchen mit 1 Mol Kristallwasser, Schmp. 123/24°. $[\alpha]_D = -19,6°$ (Chloroform), Acetat Schmp. 124°. Propionat Schmp. 135/36°. Benzoat Schmp. 128°. Spongosterin enthält keine Doppelbindung.

C l i o n a s t e r i n $C_{27}H_{46}O$: Auch aus Asterias rubens, Spongilla lacustris, Ephydatia fluviatilis (Süßwasserschwämme). Blättchen vom Schmp. 137/38°. $[\alpha]_D = -37,04°$ (Chloroform). Dibromid Schmp. 114°. Acetat Schmp. 134/35°. Benzoat Schmp. 143/44°.

M i c r o c i o n a s t e r i n $C_{27}H_{46}O$: Prismen vom Schmp. 126/27°. $[\alpha]_D = -19,8°$ (Chloroform). Propionat Schmp. 128°. Benzoat Schmp. 143—46°. Chlorid Schmp. 104/05°. Kohlenwasserstoff $C_{27}H_{46}$. Schmp. 61/62°.

A IV c. Pflanzensterine

Ebenso wie die tierische Zelle enthält auch die pflanzliche Zelle Sterine als primäre Bestandteile, die wohl auch bei der Pflanze ähnliche Funktionen zu erfüllen haben wie im Tierkörper. Neben den freien und veresterten Sterinen kommen in der Pflanze aber auch glycosidisch gebundene Sterine vor, die sog. Phytosteroline, die in einigen Fällen als Sitosterin- und Stigmasterin-glucoside erkannt werden konnten. In ihrer chemischen Reaktionsweise und in ihren Farbreaktionen entsprechen die Pflanzensterine dem Cholesterin weitgehend. Sie bilden ebenfalls mit Digitonin schwerlösliche Anlagerungsverbindungen und können daher auch die hämolytische Wirkung der Saponine aufheben[107]). Die Aufklärung ihrer Konstitution brachte das schon lange vermutete Ergebnis, daß sie auch in ihrem Aufbau dem Cholesterin ähneln. Bis auf die Struktur der Seitenkette an C-17 stimmen sie strukturell und sterisch mit dem Cholesterin überein, womit die Analogie in ihrem chemischen Verhalten ihre Erklärung findet. Umso überraschender muß aber daher die Spezifität erscheinen, mit der der Organismus der Wirbeltiere zwischen den Pflanzensterinen und dem Cholesterin zu unterscheiden vermag.

Die Hauptvertreter der Phytosterine sind das Stigmasterin $C_{29}H_{48}O$ (das einzige sicher einheitliche Pflanzensterin) und das Sitosterin $C_{29}H_{50}O$. Wie schon zu Anfang erwähnt wurde, ist das Sitosterin kein einheitlicher Stoff. Durch sehr mühselige fraktionierte Kristallisation hat man es in eine Reihe von Isomeren zerlegen können, deren Mengenverhältnisse je nach der Herkunft des Materials schwanken[108]). Besonders auffallend ist der hohe Gehalt der Pflanzensterine an ihren Hydrierungsprodukten, den S c h ö n h e i m e r[109]) damit erklärt, daß der

[107]) H a u s m a n n, Beitr. chem. Physiol. Path. 6, 576 (1905).
[108]) s. S. 114.
[109]) H. 192, 96 (1930).

Pflanze im Gegensatz zum Tier ein Exkretionsorgan für die gesättigten Stoffe fehlt, sodaß diese sich anreichern können. Nach den Ergebnissen der Untersuchungen am Sitosterin muß es zweifelhaft erscheinen, ob alle in der Literatur beschriebenen Phytosterine[110]) chemische Individuen sind. In den meisten Fällen lassen sich die geringen Abweichungen von den Konstanten des Sitosterin-Komplexes durch die Anwesenheit wechselnder Mengen der Sitosterin-Isomeren und gesättigter Sterine erklären. Die wichtigsten, gut untersuchten Pflanzensterine sind in der folgenden Übersicht angegeben:

	Formel	Schmp. °	$[\alpha]_D$ °	Acetat[111]) Schmp. °	$[\alpha]_D$ °
Stigmasterin	$C_{29}H_{48}O$	170	—45	141	
Stigmastanol	$C_{29}H_{52}O$	134/35	+28	128	+15,7
Sitosterin	$C_{29}H_{50}O$	137/38	—33,9	127	
α-Sitosterin	$C_{29}H_{50}O$	135/36	—13,4	127/28	—17,2
β-Sitosterin	$C_{29}H_{50}O$	139/40	—36,1	127/28	—39
γ-Sitosterin	$C_{29}H_{50}O$	142	—44,8	143	—46,8
Sitostanol	$C_{29}H_{52}O$	143/45	+28	144/45	+12,4
Cinchol	$C_{29}H_{50}O$	140/41	—33,5	130/31	—38

Das Stigmasterin. Eine der Hauptquellen zur Gewinnung des Stigmasterins ist das Roh-Phytosterin aus dem unverseifbaren Anteil des Öls aus der Calabar-Bohne (Physostigma venenosum). Windaus und Hauth[112]) haben eine Methode zu seiner Abtrennung von den begleitenden Sterinen ausgearbeitet, die darauf fußt, daß Stigmasteryl-acetat ein sehr schwer lösliches Tetrabromid bildet.

20 g der acetylierten Roh-phytosterine werden in 200 ccm Äther gelöst und mit 250 ccm einer 5%igen Brom-Eisessig-Mischung versetzt. Das Stigmasteryl-acetat-tetrabromid scheidet sich bald aus und wird nach mehrstündigem Stehen abfiltriert (ca. 25% der Theorie). Umkristallisiert aus Chloroform-Alkohol bildet das Produkt vier- und sechsseitige Blättchen vom Schmp. 211/12° unter Braunfärbung. Durch Reduktion mit Zinkstaub und Eisessig läßt sich das Brom wieder entfernen. Das entstandene Stigmasteryl-acetat bildet nach dem Umkristallisieren aus Alkohol Blättchen vom Schmp. 141°.

110) Biochem. Handlexikon III, 307. VIII, 489. X, 179. XIV, 826.

111) Die Tatsache, daß Phytosterin-acetate höher schmelzen als Cholesteryl-acetat wird in der Nahrungsmittelchemie verwendet, um eine Verfälschung tierischer Fette mit pflanzlichen zu erkennen.

112) B. 39, 4378 (1906).

Mit Hilfe dieser Methode läßt sich leicht entscheiden, ob in einem Phytosterin überhaupt Stigmasterin vorhanden ist und seine Menge quantitativ bestimmen. Manche Phytosterine (aus der Scopoliawurzel[113]), Brennessel[114])) erwiesen sich so als frei von Stigmasterin. Im Sterin der Sojabohne ist es zu etwa 25%[115]), im Hydrocarotin, dem Sterin der Mohrrübe, zu etwa 10% vorhanden[116]). Es ist noch in einer Reihe anderer Pflanzenöle nachgewiesen worden, z. B. im Cocosfett und Kakaoöl[117]).

Nach den Analysen des Stigmasteryl-acetat-tetrabromids hatte Windaus[118]) zuerst die Summenformel $C_{30}H_{50}O$ für das Stigmasterin angenommen. Eine Untersuchung von Sandqvist[119]) mit Hilfe der Methode der Acetylbestimmung brachte das Ergebnis, daß die Formel in $C_{29}H_{48}O$ zu ändern ist.

Wie die Darstellung einer Reihe von Estern beweist[120]), liegt das Sauerstoffatom als Hydroxyl vor. Durch Darstellung eines Ketons und einer Dicarbonsäure $C_{29}H_{50}O_4$ aus dem Perhydrierungsprodukt Stigmastanol konnte Windaus[121]) den Nachweis führen, daß das Hydroxyl sekundär ist und in einem Kohlenstoffring liegt. Die Bildung des Tetrabromids und die Aufnahme von 2 Mol Wasserstoff bei der katalytischen Hydrierung zeigen das Vorhandensein von zwei Doppelbindungen an. Nach seiner Summenformel enthält das Stigmasterin dann vier Kohlenstoffringe.

Der Aufbau des Stigmasterins ist durch die Arbeiten von Fernholz[122]) und Guiteras[123]) im Göttinger Laboratorium völlig geklärt worden (Formel s. Tafel I), und zwar läßt sich die Konstitution des Stigmasterins durch folgende Experimente begründen:

Stigmastanol-acetat geht bei der Chromsäure-Oxydation unter Verlust von 6 C-Atomen in eine Acetoxy-monocarbonsäure $C_{25}H_{38}O_4$ über.

[113]) Windaus und Brunken, H. 140, 109 (1924).
[114]) Zechmeister und Tuzson, H. 183, 74 (1929).
[115]) Bonstedt, H. 176, 269 (1928). Matthes, Arch. Pharm. 249, 436 (1911).
[116]) Roschke, B. 47, 1853 (1914).
[117]) Matthes, B. 41, 19, 1591, 2000 (1908).
[118]) B. 39, 4378 (1906).
[119]) Sandqvist und Gorton, B. 63, 1935 (1930). S. a. Windaus, v. Werder und Gschaider, B. 65, 1006 (1932).
[120]) Heiduschka und Gloth, Arch. Pharm. 253, 422 (1915).
[121]) Windaus und Brunken, H. 140, 47 (1924).
[122]) A. 507, 128 (1933), 508, 215 (1934). B. 67, 2021 (1934).
[123]) H. 214, 89 (1933).

Aus Cholestanol-acetat gewinnt man bei der gleichen Oxydation eine homologe Säure $C_{26}H_{40}O_4$, das Acetylderivat der β-3-Oxy-allocholansäure[124]). Durch Abbau nach der von Wieland an der Cholansäure ausgebildeten Methodik wurde diese Säure in die β-3-Oxy-allo-norcholansäure verwandelt. Die aus Stigmastanol dargestellte Säure erwies sich nun als identisch mit dieser Säure.

Stigmastanol-acetat ⟶ β-3-Oxy-allo-norcholansäure
↑
Cholestanol-acetat ⟶ β-3-Oxy-allo-cholansäure.

Durch diesen Abbau ist gezeigt, daß das Stigmastanol bis zum C-Atom 23 strukturell und sterisch mit dem Cholestanol übereinstimmt.

Bei der Ozonisierung des Stigmasterins erhielt Guiteras einen leicht flüchtigen Aldehyd, der in die entsprechende Säure verwandelt wurde und so als Aethyl-isopropyl-acetaldehyd identifiziert werden konnte. Eine der Doppelbindungen des Stigmasterins muß danach in der Seitenkette liegen, und zwar zwischen den C-Atomen 22 und 23. Die beiden C-Atome, die das Stigmasterin mehr enthält als Cholesterin, befinden sich in Form einer Aethylgruppe am C-Atom 24.

Die Lage der zweiten Doppelbindung konnte Fernholz nach den schon beim Cholesterin beschriebenen Methoden bestimmen. Stigmasterin addiert bei der Behandlung mit Benzopersäure abgestuft zunächst nur ein Atom Sauerstoff. Dieses erste Atom wird nicht in der Seitenkette aufgenommen, denn das entstandene Oxyd liefert bei der Ozonisierung wie Stigmasterin den flüchtigen Aldehyd. Das durch Wasseranlagerung aus dem Oxyd entstandene Triol ließ sich durch Oxydation in ein Oxy-diketon verwandeln, das weiter durch Abspaltung von Wasser in ein zweifach ungesättigtes Diketon überging (eine Doppelbindung in der Seitenkette, die zweite neu entstanden). Durch Behandlung mit Zinkstaub und Eisessig läßt sich eine Doppelbindung hydrieren. Das so entstandene Diketon ging bei der Einwirkung von Hydrazin in ein Pyridazin-Derivat über. Die beiden Ketogruppen müssen sich also in 1,4-Stellung zueinander befinden und da die eine an C-3 festgelegt ist, an den C-Atomen 3 und 6 haften. Die Doppelbindung des Stigmasterins, die bevorzugt das Sauerstoffatom addiert, liegt also zwischen den C-Atomen 5 und 6. Die zweite der Doppelbindungen des Stigmasterins liegt in β,γ-Stellung zur Hydroxylgruppe.

[124]) Die mit dem Praefix β bezeichneten 3-Oxy-cholan- oder allo-cholansäuren entsprechen in der räumlichen Anordnung des Hydroxyls dem Koprosterin bzw. dem Cholestanol.

Stigmastanon Nadeln vom Schmp. 155/56°.

Epi-stigmastanol Nadeln vom Schmp. 200° [B. 68, 1814 (1935)].

Dicarbonsäure $C_{29}H_{50}O_4$ Blättchen vom Schmp. 229/30°.

β-3-Oxy-allocholansäure Schmp. 218°, Methylester Schmp. 151°. S. a. Wieland c. s., H. 215, 15 (1933).

β-3-Oxy-allo-norcholansäure Blättchen vom Schmp. 226°, Methylester Schmp. 156°. Acetat des Methylesters Schmp. 163°.

α-Stigmasterinoxyd Blättchen vom Schmp. 152°, Acetat Schmp. 143°.

Stigmasten-triol Schmp. 254°.

Stigmasten-dion-ol Schmp. 260° unt. Zers.

Stigmasta-dien(4,22)-dion-3,6 gelbl. Nadeln vom Schmp. 155°.

Stigmasten-22-dion-3,6 Nadeln vom Schmp. 197°.

Pyridazin-derivat $C_{29}H_{46}N_2$ Schmp. 260° unt. Zers.

Ultraviolett-absorption der Derivate s. A. 510, 248 (1934).

Das Sitosterin. Der Komplex der Sitosterin-isomeren ist in den höheren Pflanzen verbeiteter als das Stigmasterin. Als Sitosterin wurden zuerst die von Burian[125]) und von Ritter[126]) aus Roggen- und Weizenkeimlingen isolierten Phytosterine bezeichnet. Spätere Untersuchungen zeigten, daß dieses Phytosterin auch in anderen Pflanzen zu finden ist. Frei von Stigmasterin kommt es, wie schon erwähnt, in der Scopoliawurzel und in der Brennessel vor. Mit dem Sitosterin identisch sind auch die Phytosterine aus der Calabar- und der Sojabohne, aus denen das Stigmasterin abgetrennt ist[127])[128]). Durch die Untersuchungen von Anderson[129]) und von Bonstedt[128]) hat sich die Uneinheitlichkeit des Sitosterins erwiesen. Besonders charakteristisch unter den Sitosterinisomeren ist das γ-Sitosterin, das im Material verschiedenster Herkunft aufgefunden wurde, so im Weizenkeim-, Mais- und Sojaöl. Schwankend ist der Gehalt des Sitosterins an seinem Hydrierungsprodukt[130]). Es wurde aus den Sterinen aus Weizenkeimöl, Weizenkleie und -endosperm, Reiskleie, Maisöl und -kleber und aus Sojasitosterin[128]) isoliert. Die Sterine aus Baumwoll- und Leinsamenöl enthalten dagegen kein Sitostanol. Zahlen über den Gehalt von Phytosterinen verschiedener Herkunft an gesättigten Sterinen hat Schönheimer[131]) angegeben. Es wurden gefunden in Sitosterinpräparaten aus: Lobelia atropoides 8,5—

[125]) Burian, Mh. f. Ch. 18, 551 (1897).

[126]) Ritter, H. 34, 461 (1902).

[127]) Windaus und Hauth, B. 40, 3682 (1907).

[128]) Bonstedt, H. 176, 269 (1928).

[129]) Anderson c. s., Am. Soc. 48, 2972, 2976, 2987 (1926), J. biol. Chem. 71, 389, 401 (1927).

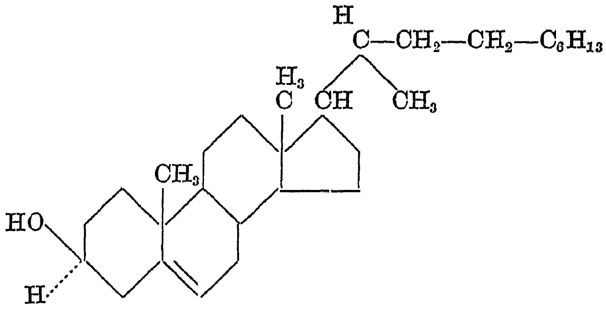
[130]) Anderson c. s., s. [129]) und Am. Soc. 46, 1450, 1717 (1924).

[131]) H. 192, 96 (1930).

10,8%, Calabarbohne 9,8%, Erbsen 16%, Reis 6—9%, Heu und Rüben 25,8%.

Lange Zeit war das Sitosterin als ein Isomeres des Cholesterins angesehen worden. Durch Bestimmung des Acetylgehaltes konnten Sandqvist und Mitarbeiter[132]) aber feststellen, daß das Sitosterin ein Homologes des Cholesterins ist und daß es ebenso wie das Stigmasterin 29 C-Atome enthält.

Das Sauerstoffatom liegt als Hydroxyl vor, wie die Darstellung einer großen Zahl von Estern beweist. Sitosterin enthält nur eine Doppelbindung, es bildet ein Dibromid und geht durch Aufnahme von einem Mol Wasserstoff bei der katalytischen Hydrierung in den gesättigten Alkohol Sitostanol $C_{29}H_{52}O$ über. Nach seiner analytischen Zusammensetzung muß das Sitosterin 4 Kohlenstoffringe enthalten. Die Hydroxylgruppe ist sekundär gebunden und befindet sich in einem der Kohlenstoffringe, denn durch Oxydation läßt sich Sitostanol in eine Dicarbonsäure mit der gleichen Zahl von C-Atomen verwandeln[133]).



Der Aufbau des Sitosterinmoleküls (bzw. eines der Sitosterinisomeren) läßt sich bis jetzt für 23 C-Atome sicher angeben:

Durch Chromsäureoxydation konnte Ruzicka[134]) aus Sitostanolacetat das 3-Oxy-aetio-allo-cholanon-17 erhalten, das auf die gleiche Weise aus Cholestanol-acetat entsteht. Dalmer und Mitarbeiter[135]) wandelten Sitostanol über das Sitostanon in Epi-sitostanol um. Das Acetylderivat des Epi-sitostanols lieferte bei der Chromsäure-oxydation eine Oxy-carbonsäure $C_{23}H_{38}O_3$, die als 3-Oxy-nor-allo-cholansäure identifiziert werden konnte. Das Vergleichspräparat war durch Oxydation des

[132]) Sandqvist und Bengtsson, B. 64, 2167 (1931). Windaus c. s., B. 65, 1006 (1932).

[133]) Windaus und Rahlén, H. 101, 223 (1918), dort frühere Literatur.

[134]) Ruzicka und Eichenberger, Helv. Ch. A. 18, 430 (1935).

[135]) B. 68, 1814 (1935).

Epi-cholestanol-acetats zur 3-Oxy-allo-cholansäure und anschließende Verkürzung um ein C-Atom dargestellt worden.

F e r n h o l z[136]) konnte auf den gleichen, zuvor beim Stigmasterin beschriebenen Wegen aus dem Sitostan-triol ein Diketon darstellen, das mit Hydrazin ein Pyridazin-Derivat liefert. Eine Sitosterinkomponente ist also sicher β-γ-ungesättigt.

Worin sich Sitostanol und Stigmastanol und wie sich die einzelnen Sitosterinisomeren voneinander unterscheiden, läßt sich zur Zeit noch nicht angeben.

Sitostanon (aus γ-Sitostanol) Schmp. 163°. $[\alpha]_D = +38°$.
Sitostan Schmp. 87°. $[\alpha]_D = +20{,}2°$.
Sitostandicarbonsäure Schmp. 228°. $[\alpha]_D = +30{,}3°$.
Epi-sitostanol Schmp. 203°. $[\alpha]_D = +26°$. Acetat: Schmp. 88°. $[\alpha]_D = +28°$.
3-Oxy-nor-allo-cholansäure Schmp. 205—07°. $[\alpha]_D = +21°$.
Acetat der Säure: Schmp. 235°.
Methylester: Schmp. 169—70°.

Eine kritische Ordnung des über Pflanzensterine vorliegenden Materials ist im Augenblick noch sehr schwierig, einmal im Hinblick auf die beim Sitosterin vorliegenden Verhältnisse und zweitens, weil die meisten Sterine nicht eingehender untersucht wurden und lediglich ihre Konstanten zur Charakterisierung der Sterinfraktion eines Pflanzenmaterials angegeben sind. Augenscheinlich verschieden von Sitosterin und Stigmasterin sind das Sterin aus Rüböl, das Brassica-sterin[137]) und das Spinasterin aus dem Spinatfett[138]). An zwei Beispielen sei gezeigt, wie die Untersuchungsmethoden der Sterinchemie soweit entwickelt sind, daß es ein leichtes ist, in allen interessierenden Fällen eine sichere Entscheidung über die Zugehörigkeit eines Pflanzenstoffes zur Gruppe der Sterine zu treffen. Vor 50 Jahren hatten H e s s e[139]) und L i e b e r m a n n[140]) aus der Chinarinde einen sterinartigen Stoff isoliert, der Cinchol genannt wurde und dem man zunächst die Zusammensetzung $C_{20}H_{34}O$ zuerteilte. Durch Analyse des Dinitro-benzoats legte W i n d a u s[141]) im Jahre 1933 die Summenformel zu $C_{29}H_{50}O$ fest und sprach die An-

[136]) A. 508, 218 (1934), s. a. P i c k a r d und Y a t e s, Soc. 93, 1928 (1908). W i n d a u s und B r u n k e n, H. 140, 52 (1924).

[137]) W i n d a u s und W e l s c h, B. 42, 612 (1909). S c h m i d und W a s c h k a u, Mh. f. Ch. 48, 139 (1927).

[138]) H a r t und H e y l, J. biol. Chem. 95, 311 (1932). H e y l und L a r s e n, Am. Soc. 56, 942 (1934).

[139]) A. 228, 294 (1885).

[140]) B. 17, 871 (1884), 18, 1805 (1885).

[141]) W i n d a u s und D o p p e, B. 66, 1689 (1933).

sicht aus, daß dieser Stoff in die Gruppe der Sitosterine einzureihen sei. Den sicheren Nachweis hierfür erbrachte Dirscherl[142]) kürzlich, indem er das Dihydro-cinchol zu dem gleichen 3-Oxy-aetio-allo-cholanon-17 abbaute, das Ruzicka aus Cholestanol und Sitostanol gewonnen hatte. Andererseits konnten Windaus und Schulze[143]) mit Hilfe der Selendehydrierung zeigen, daß das Onocerin, das als das „Sterin“ der Hauhechel bezeichnet wird, nicht mit den typischen Sterinen verwandt ist, sondern der Gruppe der Poly-terpene zuzuordnen ist.

Lohnend wäre die nähere Untersuchung einer sterinähnlichen Substanz, die Zechmeister[144]) aus den Kelchblättern der Sonnenblume isoliert hat. Dieser Stoff von der Zusammensetzung $C_{21}H_{36}O_2$ ist isomer mit dem Pregnandiol, dem Stoff, der das Follikelhormon im Schwangerenharn begleitet. Möglicherweise steht dieser Stoff in ähnlicher Beziehung zu dem ja auch in Pflanzen angetroffenen Follikelhormon.

Heilbron[145]) sieht das von ihm aus Algen isolierte Fucosterin als charakteristisch für die Familie der Algen an. Das Fuco-sterin ist doppelt ungesättigt. Durch katalytische Hydrierung läßt es sich in Stigmastanol verwandeln, es steht also chemisch in naher Beziehung zu den Sterinen der Phanerogamen.

Brassicasterin $C_{28}H_{46}O$(?): Schmp. 148°. $[\alpha]_D = -64{,}4°$.
Acetat Schmp. 157—58°. Acetat-tetrabromid Schmp. 209°.
Spinasterin $C_{28}H_{46}O$: Schmp. 168—69°. $[\alpha]_D = -1{,}8°$.
Acetat: Schmp. 183—85°. $[\alpha]_D = -4{,}7°$.
Verbindung $C_{21}H_{36}O_2$: Schmp. 243°. $[\alpha]_D = +41{,}2°$.
Fucosterin $C_{29}H_{48}O$: Schmp. 124°. $[\alpha]_D = -38{,}4°$.
Acetat: Schmp. 118/19°. Benzoat: Schmp. 120°.
Die beiden Doppelbindungen sind wahrscheinlich nicht konjugiert, in der Seitenkette ist keine vorhanden.

A IV d. Pilzsterine

Die echten Pilze enthalten eine Gruppe von Sterinen, die sich weder bei den Phanerogamen, noch im Tierreich findet. Durch eine eigentümliche Farbreaktion (die sog. umgekehrte Salkowskische Probe) unterscheiden sich diese Pilzsterine vom Cholesterin und den Phytosterinen[146]): löst man ein Pilzsterin in Chloroform und setzt konz. Schwefelsäure hinzu, so färbt sich die Säure tiefrot, während die Chloroform-

[142]) H. 235, 1 (1935). H. 237, 268 (1935).
[143]) s. H. 238, 35 (1936).
[144]) H. 192, 22 (1930).
[145]) Nature 133, 419 (1934), Soc. 1934, 1572.
[146]) Gérard, C. 1895 II, 229.

schicht farblos bleibt; beim Cholesterin und Sitosterin wird das Chloroform rot gefärbt, die Schwefelsäure fluoresziert nur grünlich. Gegenüber Digitonin verhalten sich die Pilzsterine wie die übrigen; sie liefern schwer lösliche Anlagerungsverbindungen und vermögen daher auch die hämolytische Wirkung der Saponine aufzuheben[147]).

Das Ergosterin wurde zuerst von Tanret[148]) aus dem Mutterkorn in reiner Form dargestellt; es ließ sich später in einer großen Zahl von Pilzen nachweisen. In den Pilzen wird es häufig von einem zweiten Sterin, dem Fungisterin begleitet[148]). Maclean[149]) und Windaus und Grosskopf[149]) konnten den Nachweis erbringen, daß das Sterin der Hefe mit dem Ergosterin identisch ist. Ergosterin aus Hefe[150]) oder Mutterkorn[151]) enthält stets einen kleinen Prozentsatz seines Dihydro-Derivats, des α-Dihydro-ergosterins. In der Hefe wird es noch von einer Reihe anderer Sterine begleitet, unter denen das Zymo-sterin[152]) überwiegt. Die Einheitlichkeit der in der Tabelle zusammengestellten begleitenden Sterine[153]) ist fraglich, zumal ihre Isolierung, die durch fraktionierte Kristallisation der Benzoate erfolgt, nicht immer reproduzierbar gewesen ist. Auch die angegebene analytische Zusammensetzung ist wohl noch einer Korrektur bedürftig. Das

Name	Formel	Doppelb.	Schmp.	$[\alpha]_D$	Benzoate	
					Schmp.	$[\alpha]_D$
Zymosterin	$C_{27}H_{44}O$	2	108/10	+ 47,3	126/28 klar b. 138	+36,4
Ascosterin	$C_{27}H_{46}O$	1	141/42	+ 45	130/31	+37
Fäcosterin	$C_{27}H_{46}O$	1	161/63	+ 42,1	144/46	+34,7
Episterin	$C_{27}H_{44}O$	2	135/36	+ 6,2	161/63	+11,8
Anasterin	$C_{27}H_{44}O$	2	157/59	— 8,1	180/82	—13,8
Sterin 145°	$C_{27}H_{44}O$	2	144/46	— 33,8	158/60	— 4,4
Hyposterin	$C_{27}H_{42}O$	3	100/02	+ 12,5	119/21 klar b. 138	+19,1
Kryptosterin	$C_{27}H_{42}O$	3	135/36	+ 64	185/87	+68,8
Neosterin	$C_{27}H_{44}O$?	2	164/65	—105	173/75	—50,6
Ergosterin	$C_{28}H_{44}O$	3	163	—132	168/70	—71,5
Dihydro-erg.	$C_{28}H_{46}O$	2	173/74	— 20,4		

[147]) Hausmann, Beitr. chem. Physiol. Path. 6, 577 (1905).

[148]) C. r. Acad. d. Sc. 108, 98 (1889). Ann. Chim. Phys. 20, 289 (1890). C. 1908 II, 1933.

[149]) H. 124, 8 (1922). Biochem. J. 14, 483 (1920).

Neo-sterin wird von Callow[150]) als ein Gemisch von Ergosterin und α-Dihydro-ergosterin angesehen.

Das Zymosterin ist noch durch weitere Derivate charakterisiert worden. Zymosterylacetat: Blättchen vom Schmp. 104/06°. $[\alpha]_D = + 33{,}5°$. Zymosterylacetatdibromid: Blättchen vom Schmp. 168/69°. $[\alpha]_D = + 9{,}7°$. α-Dihydro-zymosterin, durch katalytische Hydrierung unter Aufnahme von 1 Mol Wasserstoff: Blättchen aus Methylalkohol, Schmp. 120/22°. $[\alpha]_D = + 20{,}7°$. Daraus durch Behandlung mit Chlorwasserstoff: β-Dihydro-zymosterin (Blättchen vom Schmp. 99/100°. $[\alpha]_{5461} = + 32{,}1°$), das durch weitere katalytische Hydrierung in Zymostanol übergeht. Aus Methylalkohol rautenförm. Blättchen vom Schmp. 139/40°. $[\alpha]_{5461} = + 20{,}6°$. Zymostanolacetat: Stäbchen vom Schmp. 130/31°. Nach den Analysen des Zymosteryl-acetatdibromids sieht Reindel[152]) eine Summenformel $C_{30}H_{50}O$ für das Zymosterin als möglich an. Es ist sehr wahrscheinlich, daß Zymosterin mehr als 27 C-Atome enthält.

Aus Ergosterin-mutterlaugen der Gewinnung aus Hefe wurde das Cerevisterin[154]) isoliert. Schmp. 265,3°. $[\alpha]_{5461} = - 57{,}4°$ (Chloroform). Diacetat: Schmp. 170,5°. $[\alpha]_{5461} = - 162{,}9°$. Cerevisterin hat die Zusammensetzung $C_{29}H_{48}O_3$ (im Original $C_{20}H_{40}O_3$?), es soll zwei Doppelbindungen enthalten.

Das Fungisterin bildet Blättchen mit 1 Mol Kristallwasser. Schmp. 144/45°. $[\alpha]_D = - 22{,}4°$. Acetat: Schmp. 158/59°. Seine Zusammensetzung ($C_{25}H_{40}O$?) steht noch nicht fest.

Aus Mutterkorn ist noch ein weiteres Sterin ($C_{27}H_{46}O$) vom Schmp. 120/25°, $[\alpha]_D = - 2°$ isoliert worden[151]). Acetat: Schmp. 121/24°.

Das Ergosterin. Von den Pilzsterinen hat das Ergosterin dadurch, daß es sich unter der Einwirkung des ultravioletten Lichts in einen antirachitisch wirksamen Stoff verwandeln läßt, eine außerordentlich große Bedeutung erlangt. Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich daher mit der Untersuchung der Verbreitung und der Anreicherung des Ergosterins durch zweckmäßige Variation der Kulturbedingungen. In seinen umfangreichen Untersuchungen über die Inhaltsstoffe der höheren Pilze hat Zellner[155]) das Vorkommen des Ergosterins (meist

[150]) Callow, Biochem. J. 25, 87 (1931). Windaus c. s., A. 483, 17 (1930). B. 64, 850 (1931).

[151]) Heyl, Am. Soc. 52, 3688 (1930), 54, 1074 (1932). Hart und Emerson, Am. Soc. 54, 1077 (1932).

[152]) Smedley-Maclean, Biochem. J. 22, 22 (1928). Reindel und Weickmann, A. 475, 86 (1929), 482, 120 (1930). Heilbron und Sexton, Soc. 1929, 2255.

[153]) Wieland c. s., A. 473, 300 (1929), 482, 36 (1930), 489, 31 (1931).

[154]) Honeywell und Bills, J. biol. Chem. 97, XXXIX (1932).

[155]) Mh. f. Chem. 25, 537 (1904); 26, 265, 727 (1905); 28, 1285 (1907); 29, 757 (1908); 30, 3, 837 (1909); 32, 133 (1911); 34, 321 (1913); 36, 611 (1915); 38, 319 (1917); 39, 603 (1918); 41, 443 (1920); 44, 9 (1923); 50,

mit Fungisterin) in einer großen Zahl von Pilzen nachgewiesen. Auch in Pilzharzen[156]) und in Flechten[157]) wurde es aufgefunden. Tanret[158]) hat es im Mutterkorn der verschiedenen Getreidearten nachweisen können; es wurde weiter aus Aspergillus oryzae[159]), Fischeri[159]) und Sydowi[160]) isoliert. Für seine technische Gewinnung sind die Untersuchungen über die Verbreitung in der Hefe von Bedeutung[161]). Es hat sich gezeigt, daß für den Gehalt weniger die Heferasse als die Kulturbedingungen entscheidend sind[162]). Die Hefe vermag mit Glucose oder anderen Kohlenhydraten als einziger Kohlenstoffquelle das Ergosterin zu synthetisieren[163]). Vor allem hat die Tatsache Interesse, daß bei den Versuchen, die optimalen Bedingungen seiner Bildung zu erzielen, sich einwandfrei herausgestellt hat, daß der Ergosteringehalt stets parallel mit dem Gesamtgehalt an Lipoiden ansteigt[164]). Damit gewinnt die schon beim Cholesterin ausgesprochene Vermutung, daß die Sterinbildung sich aus dem Kohlenhydrat-Fett-Stoffwechsel abzweigt, an Wahrscheinlichkeit.

Die Angaben jedoch, daß Ergosterin in tierischen Organen oder in höheren Pflanzen in kleiner Menge vorkomme, sind heute nicht mehr als sicher zu bezeichnen. Der Nachweis stützt sich auf spektrographische Untersuchungen oder auf die antirachitische Aktivierbarkeit der Substanzen. Wie in dem Abschnitt über die Bestrahlungsprodukte des Ergosterins (s. S. 311) auseinandergesetzt wird, handelt es sich wahrscheinlich in diesen Fällen um ergosterin-ähnliche Stoffe, Dehydrosterine, die sich von den tierischen und pflanzlichen Sterinen ableiten und die gleiche Eigenschaften besitzen. Einer Nachprüfung bedarf noch die Isolierung des Ergosterins aus Ochsenblut[165]).

201, 893 (1928); 56, 200 (1930); 62, 214 (1933). S. a. Sumi, Bio. Z. 204, 397 (1929). C. 1932 I, 2199.

[156]) Fröschl und Zellner, Mh. f. Chem. 53/54, 146 (1929).

[157]) Zellner, Mh. f. Chem. 59, 300 (1932), 64, 6 (1934).

[158]) Bull. Soc. chim. France 31, 444 (1923). S. a. Mellanby c. s., Biochem. J. 23, 710 (1929).

[159]) Pruess c. s., J. biol. Chem. 97, 483 (1932). s. C. 1933 II, 2552 und Sumi,[155]).

[160]) Strong und Peterson, Am. Soc. 56, 952 (1934).

[161]) Heiduschka und Lindner, H. 181, 15 (1929). Castille und Ruppol, C. 1934 I, 3607.

[162]) Bills c. s., J. biol. Chem. 87, 259 (1930).

[163]) Birkinshaw c. s., Biochem. J. 25, 1977 (1931). Massengale, Bills und Prickett, J. biol. Chem. 94, 213 (1931).

[164]) Halden c. s., H. 234, 1 (1935), 225, 249 (1934). Naturw. 21, 660 (1934).

[165]) Küster c. s., B. 61, 809 (1928).

Das geeignetste Ausgangsmaterial zur Darstellung des Ergosterins stellt die Hefe dar[166]). Preßhefe oder Hefefett wird in alkoholischer Suspension mit konzentrierter wäßriger Kalilauge verseift (unter Kochen am Rückflußkühler oder unter Schütteln in der Kälte). Nach dem Verdünnen mit Wasser wird die Lösung mit Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung wird mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingeengt. Der Rückstand erstarrt zu einem Kristallbrei, der mit Petroläther ausgewaschen und zur Reinigung aus Alkohol, Benzol-Alkohol oder Essigester-Alkohol umkristallisiert wird. Zur völligen Reinigung empfiehlt sich auch eine Umwandlung des Ergosterins in Ester (Acetat, Benzoat oder Isobutyrat) und Verseifung derselben[167]).

Das Ergosterin kristallisiert aus Alkohol in Blättchen, die ein Molekül Kristallwasser sehr fest gebunden enthalten. Aus wasserfreien Lösungsmitteln wie Äther oder Essigester kristallisiert es in Nadeln, die kein Kristallösungsmittel enthalten. Schmp. 163°. Das Ergosterin ist stark linksdrehend. In Chloroformlösung ist $[\alpha]_D = -132°$ und $[\alpha]_{5461} = -170°$.

Das Ultraviolett-Absorptionsspektrum (s. S. 293) zeigt charakteristische Banden bei 260, 269, 281 und 293 mμ[168]). In Wasser ist Ergosterin unlöslich, ziemlich schwer löslich in Methanol und Petrolaether. In Chloroform, Essigester und Benzol ist es leicht löslich. Es löst sich in 525 Teilen kalten, in 36 Teilen siedenden Alkohols, in 200 Teilen kalten und in 32 Teilen heißen Acetons. Äther nimmt in der Kälte in 50 Teilen, in der Siedehitze in 28 Teilen 1 Teil Ergosterin auf.

Ergosterin ist im Hochvakuum bei etwa 250° noch unzersetzt destillierbar[169]). Längeres Erhitzen auf höhere Temperatur führt jedoch eine Zersetzung herbei, die vielleicht durch Abspaltung von Wasser, Methan oder der Seitenkette bedingt ist. Beim Liegen an der Luft färbt sich das Ergosterin allmählich gelb und nimmt einen eigentümlichen, dumpffauligen Geruch an. Das Umwandlungsprodukt, das aus verschiedensten Oxydationsprodukten besteht, ist in Methanol spielend leicht löslich. Wesentlich beständiger sind die Ester des Ergosterins. Die Feststellung von Rosenheim und King[170]), daß Cholesterin aus dem Hirn einer 1½ Jahrtausend alten Mumie noch antirachitisch aktivierbar war, kann nicht mehr als Beweis für die Beständigkeit des Ergosterins im Gemisch

---

[166]) H. 124, 8 (1922). A. 460, 218 (1928). H. 181, 15 (1929).

[167]) Callow, Biochem. J. 25, 79 (1931). Bills c. s., J. biol. Chem. 80, 15 (1928).

[168]) Pohl, Naturw. 1927, 433. Heilbron c. s., Soc. 1928, 47. Smakula, Nachr. Ges. Wiss. Gött. 1928, 49.

[169]) Reindel und Detzel, A. 475, 78 (1929).

[170]) Biochem. J. 23, 166 (1926).

mit Cholesterin angesehen werden; sie bezieht sich nur auf das im Cholesterin vorhandene Provitamin.

Zum Nachweis des Ergosterins eignen sich eine ganze Zahl von Farbreaktionen, von deren Anwendung aber die gleichen, schon beim Cholesterin gemachten Einschränkungen gelten.

Bei der Liebermann-Burchard'schen Probe färbt sich die Lösung sehr rasch über rot, blauviolett, stahlblau, blaugrün bis grün[171]). Die „umgekehrte" Salkowski'sche Reaktion wurde schon oben erwähnt.

Reaktionen nach Tortelli-Jaffé[172]): Eine Lösung von Ergosterin in 10 ccm Chloroform wird mit 5 ccm reinstem Olivenöl, 1 ccm Eisessig und 2,5 ccm einer 10%igen Brom-Chloroformlösung versetzt. Es tritt eine Grünfärbung auf, die noch 1 mg Ergosterin zu erkennen gestattet. Durch Unterschichten einer Ergosterin-Eisessig-Lösung mit Brom-Chloroform-Lösung entsteht ein grüner Ring.

Reaktionen nach Rosenheim[173]): Zu einer Lösung von Ergosterin in Chloroform fügt man eine Lösung von 9 Teilen Trichloressigsäure in 1 Teil Wasser. Es tritt eine Rotfärbung auf, die nach einiger Zeit in ein Hellblau übergeht. Auf diese Weise lassen sich noch 0,01 mg Ergosterin erkennen.

Verschmilzt man einen Ergosterinkristall mit Chloralhydrat auf dem Wasserbad, so entsteht zunächst eine karminrote Färbung, die sich über grün in ein tiefes Blau verwandelt.

Durch Vermischen einer Ergosterin-Chloroformlösung mit einer Lösung von Antimontrichlorid entsteht eine rote Färbung der Lösung[172]).

Zur quantitativen Bestimmung des Ergosterins eignet sich die kolorimetrische Auswertung der Liebermann-Burchard'schen Reaktion[171]) und der Reaktion mit Trichloressigsäure[174]) gegenüber eingestellten Ergosterinlösungen oder Standard-Farblösungen. Eine sehr exakte und empfindliche Methode stellt auch die Bestimmung der Intensität der Ultraviolett-absorptionsbanden dar, die bei verschiedenen physiologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Ergosterinkonzentration gedient hat. Ferner eignet sich die Digitoninmethode als quantitative gravimetrische Bestimmungsmethode[175]).

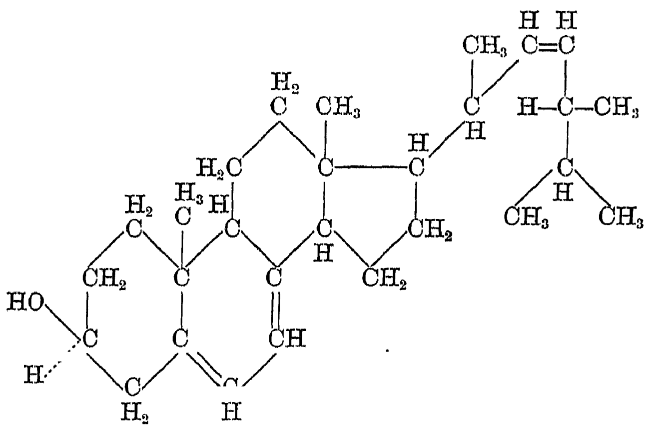
Die Formel des Ergosterins ist $C_{28}H_{44}O$. Die gleichen Schwierigkeiten, die einer sicheren Festlegung der Summenformel des Cholesterins im Wege standen, haben sich auch beim Ergosterin bemerkbar gemacht. Von seiner ersten Reindarstellung bis zum Jahre 1932, als es schon durch seinen Übergang in einen antirachitisch wirksamen Stoff im Brennpunkt des Interesses stand, hatte man ihm die Formel $C_{27}H_{42}O$ zugeschrieben, so daß es sich nur durch den Mindergehalt an Wasserstoff

171) H. 181, 15 (1929).
172) Häußler und Brauchli, Helv. Ch. A. 12, 187 (1929). Heilbron und Spring, Biochem. J. 24, 133 (1929).
173) Rosenheim c. s., Biochem. J. 23, 47 (1929), 25, 74 (1931).
174) Callow, Biochem. J. 25, 87 (1931).
175) Pénau und Hardy, C. 1929 I, 2909.

vom Cholesterin unterschied. Erst die Analyse von Derivaten mit mehreren Hetero-Atomen führte zur Aufstellung der richtigen Summenformel durch Windaus und Lüttringhaus[176]). Das Ergosterin hat die Zusammensetzung $C_{28}H_{44}O$, es enthält also ein C-Atom mehr als das Cholesterin. Die Ausführung der Acetylbestimmung am Ergostanolacetat, dem Perhydrierungsprodukt des Ergosteryl-acetats, liefert Werte, die nur einer Summenformel mit 28 C-Atomen entsprechen können[177]).

Die Konstitution des Ergosterins

Der Aufbau des Ergosterinmoleküls ist vor allem durch die Arbeiten von Windaus und seinen Mitarbeitern festgelegt worden, und zwar führten diese Untersuchungen zu folgendem Formelbild:



Die Konstitutionsaufklärung stützt sich auf folgende Experimente:

a) Das Sauerstoffatom liegt als Hydroxyl vor. Durch Umsetzung von Ergosterin mit Säureanhydriden oder Säurechloriden in Pyridin lassen sich eine große Zahl von Estern darstellen. Durch katalytische Hydrierung der Doppelbindungen erhält man einen gesättigten Alkohol $C_{28}H_{50}O$, das Ergostanol[178]). Dieser Alkohol läßt sich zu einem Keton dehydrieren, das durch weitere Oxydation in eine Dicarbonsäure mit der gleichen Zahl von C-Atomen $C_{28}H_{48}O_4$ übergeht. Die Hydroxylgruppe des Ergosterins ist also sekundär und steht in einem Kohlenstoffring.

b) Ergosterin enthält drei Doppelbindungen und vier Kohlenstoffringe. Durch die quantitative Bestimmung der Wasserstoffaufnahme bei der katalytischen Hydrierung ist sicher bewiesen, daß Ergosterin drei

[176]) Nachr. Ges. Wiss. Göttingen 1932, 4.

[177]) Windaus, v. Werder und Gschaider, B. 65, 1008 (1932).

[178]) Reindel, A. 460, 223 (1928), 466, 140 (1928).

Doppelbindungen enthält[179]). Andere Methoden wie Benzopersäuretitration, Bestimmung der Hüblschen Jodzahl oder der Addition von Brom bestätigen dieses Ergebnis[180]). Das Perhydrierungsprodukt des Ergosterins, das schon oben erwähnte Ergostanol, hat entsprechend die Zusammensetzung $C_{28}H_{50}O$. Aus ihm läßt sich über das Chlorid durch Reduktion mit Natrium und Amylalkohol der zugehörige Grundkohlenwasserstoff, Ergostan, darstellen[181]). Er hat die Zusammensetzung $C_{28}H_{50}$, zeigt also gegenüber einem Paraffin mit der gleichen Zahl von Kohlenstoffatomen ein Defizit von 8 Wasserstoffatomen, das durch das Vorhandensein von vier Kohlenstoffringen bedingt ist.

c) Ergostan enthält das gleiche Vierringskelett wie das Cholestan. Den Nachweis, daß diese vier Ringe im Ergostan denen im Cholestan entsprechen, erbrachte eine Arbeit von Chuang[182]) aus dem Göttinger Laboratorium, nachdem Diels schon gezeigt hatte, daß Ergosterin durch Selendehydrierung in den Kohlenwasserstoff $C_{18}H_{16}$ übergeht. Es gelang, durch energische Chromsäureoxydation aus dem Ergostan fünf Kohlenstoffatome abzuspalten und zu einer Monocarbonsäure $C_{23}H_{38}O_2$ zu kommen. Diese Abbausäure erwies sich nun als identisch mit der Nor-allo-cholansäure, die durch den Abbau der Allo-cholansäure analog dem Wielandschen Abbau der Cholansäure dargestellt wurde. (Formel s. Übersichtstafel.) Damit ist der Nachweis erbracht, daß das Ergostan bis zum C-Atom 23 strukturell und sterisch mit dem Cholestan übereinstimmt.

$$C_{19}H_{31}-\underset{\displaystyle CH_3}{\overset{H}{C}}-CH_2-CH_2-C_5H_{11} \longrightarrow C_{19}H_{31}-\underset{\displaystyle CH_3}{\overset{H}{C}}-CH_2-COOH$$

Nor-allo-cholansäure

d) Die Hydroxylgruppe steht am C-Atom drei. Einen ganz analogen Abbau, der dem beim Stigmasterin beschriebenen entspricht, haben Fernholz und Chakravorty[183]) mit Ergostanol-acetat durchgeführt. Sie kamen zu der gleichen 3-Oxy-nor-allocholansäure, die auch aus Stigmastanol und aus Cholestanol durch oxydativen Abbau entsteht. Das Ergostanol stimmt also nicht nur in dem Vierringskelett, sondern

[179]) Windaus und Linsert, A. 465, 154 (1928).

[180]) Maclean und Thomas, Biochem. J. 14, 488 (1920). Reindel und Niederländer, A. 475, 147 (1929). Windaus und Lüttringhaus, A. 481, 119 (1930).

[181]) Reindel und Walter, A. 460, 222 (1928).

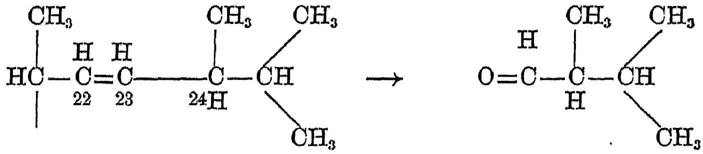
[182]) A. 500, 270 (1933).

[183]) B. 67, 2021 (1934).

auch in der Stellung der Hydroxylgruppe am C-Atom drei und deren sterischen Anordnung mit dem Cholestanol überein.

e) Der Aufbau der Seitenkette des Ergosterins. Reindel und Kipphan[184]) konnten aus dem Ozonid des Ergosterins nach der Aufspaltung durch katalytische Hydrierung durch Wasserdampfdestillation einen leicht flüchtigen Aldehyd gewinnen. Nach den Analysen seines Semicarbazons und des Dinitrophenylhydrazons hat er die Zusammensetzung $C_6H_{12}O$. Durch Oxydation wurde er in die entsprechende Säure $C_6H_{12}O_2$ übergeführt, die in Form ihres Amids mit dem Amid der Methylisopropylessigsäure identifiziert werden konnte. Reindel erhielt bei diesen Umsetzungen stets einen optisch inaktiven Aldehyd. Guiteras[185]) konnte zeigen, daß man bei der Verkochung des Ozonids zunächst den Aldehyd in der linksdrehenden Form bekommen kann, wenn man in schwach saurer Lösung arbeitet. In alkalischer Lösung racemisiert sich der Aldehyd außerordentlich rasch, ein Befund, der durch die Nachbarschaft der Aldehydgruppe zum Asymmetriezentrum seine Erklärung findet.

Nach diesen Untersuchungen ergibt sich der Aufbau der Seitenkette des Ergosterins zu folgendem Formelbild:



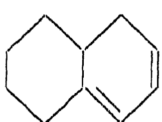
Ergosterin enthält eine Doppelbindung zwischen den C-Atomen 22 und 23. Das C-Atom, das es mehr enthält als Cholesterin, steht als Methylgruppe an C-24. In Übereinstimmung mit dieser Formulierung wurde bei der energischen Oxydation von Tetrahydro-ergosterin und Ergostanol ein Keton mit 9 C-Atomen $C_9H_{18}O$ erhalten[185]).

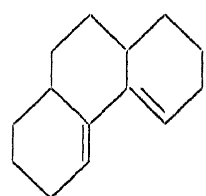
f) Die beiden anderen Doppelbindungen des Ergosterins sind konjugiert und liegen in einem Ring. Die optischen Eigenschaften des Ergosterins, Molrefraktion[186]) und das langwellige Ultraviolettspektrum, machen das Vorhandensein von mindestens einer Konjugation zweier Doppelbindungen sehr wahrscheinlich. In Übereinstimmung damit addiert Ergosterin das spezifische Reagens auf konjugierte Doppelbindungen, Maleinsäureanhydrid[187]). Die Konjugation der Doppelbindun-

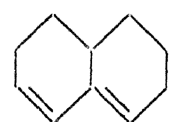
[184]) A. 493, 181 (1932).
[185]) A. 494, 116 (1932).
[186]) v. Auwers und Wolters, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen 1931, 101.
[187]) Windaus und Lüttringhaus, B. 64, 850 (1931).

gen bedingt es auch, daß Ergosterin zum Unterschied vom Cholesterin durch Natrium und Alkohol glatt hydriert werden kann[188]). Es geht hierbei in das α-Dihydro-ergosterin über, das noch die Doppelbindung der Seitenkette und eine in den Ringen enthält.

Aus der Addition von Maleinsäureanhydrid läßt sich noch eine einschränkende Aussage über ihre Lage machen[189]). Eine Addition von Maleinsäureanhydrid ist an konjugierte Doppelbindungen, die in Ringsystemen liegen, auf Grund der Bredtschen Regel nur dann möglich, wenn die beiden Doppelbindungen entweder in einem Ring liegen oder wenn sie sich auf zwei nicht miteinander kondensierte Ringe verteilen (Fall I und II). Liegen die Doppelbindungen aber in zwei kondensierten Ringen (Fall III), so würde die Addition von Maleinsäureanhydrid zu einem Gebilde führen, das eine Doppelbindung enthält, die von einem Brückenkopf ausgeht.


I


II


III

Eine Entscheidung zwischen den ersten beiden Möglichkeiten gibt der oxydative Abbau des Ergosterins mit Salpetersäure. Hierbei entsteht die 1-Methyl-2,3,4,5-benzol-tetracarbonsäure[190]). Man muß annehmen, daß die beiden Doppelbindungen in einem Ring liegen, und daß das Dihydrobenzol-system unter Wanderung einer Methylgruppe zum aromatischen System dehydriert wird.

g) Die beiden konjugierten Doppelbindungen liegen von C-5 nach C-6 und von C-7 nach C-8. Um die Lage der beiden konjugierten Doppelbindungen des Ergosterins festzulegen, muß man eine von ihnen in Beziehung zu der Hydroxylgruppe, deren Stellung am C-Atom drei nach den obigen Versuchen bewiesen ist, bringen. Das ist Windaus und seinen Mitarbeitern[191]) auf folgendem Wege gelungen: Ergosterin addiert leicht an eine Doppelbindung ein Mol Benzopersäure[192]). Es bildet sich ein Ergosta-dien-triol-monobenzoat, das ein veresterbares und ein nicht-

[188]) Windaus und Brunken, A. 460, 232 (1928).
[189]) Windaus, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen 1933, 92.
[190]) Reindel und Niederländer, A. 482, 264 (1930). Inhoffen, A. 494, 116 (1932).
[191]) Windaus, Inhoffen und v. Reichel, A. 510, 248 (1934).
[192]) Windaus und Lüttringhaus, A. 481, 127 (1930).

veresterbares Hydroxyl, ein sekundäres (an C-3) und ein tertiäres enthält. Bei der katalytischen Hydrierung nimmt das aus dem obigen Stoff dargestellte Ergosta-dien-triol-diacetat nur ein Mol Wasserstoff auf. Das entstehende Ergosten-triol-diacetat enthält noch eine schwer hydrierbare Doppelbindung, die erst nach einer Umlagerung mit Hilfe von Salzsäure, die zu dem sog. Ergosten-triol-diacetat B führt, durch Wasserstoff abgesättigt werden kann[193]). Auf diesem Wege kommt man zu dem gesättigten Ergostantriol, mit dem die gleichen Umsetzungen ausgeführt wurden, die vom Cholestantriol aus die Festlegung der Doppelbindung in β,γ-Stellung zur Hydroxylgruppe gestatteten. Durch Chromsäureoxydation wird das Ergostantriol in ein Oxy-diketon verwandelt, das bei der Behandlung mit Chlorwasserstoff ein Molekül Wasser abspaltet und in ein Ergosten-dion übergeht. Dieser Stoff entspricht in seinen Eigenschaften völlig dem Oxy-cholestenon. Er reagiert in einer Enolform, von der sich ein Kalisalz und ein Äther ableitet, und auch die Ultraviolettspektren der analogen Derivate des Oxy-cholestenons und des Ergostendions stimmen völlig überein. Durch Hydrierung mit Zink und Eisessig geht der Stoff in ein gesättigtes Diketon, ein Ergostandion über, das ebenso wie das entsprechende Cholestan-dion-3,6 mit Hydrazin ein Pyridazinderivat bildet. Da die eine Ketogruppe am C-Atom drei steht, muß sich die andere in 4-Stellung hierzu, an C-Atom 6 befinden. Der Stoff ist also ein Ergostadion-3,6. Die dritte Hydroxylgruppe im Ergostantriol, die tertiär ist, findet ihren Platz am C-Atom 5. Mit dieser Nachbarstellung zu der Hydroxylgruppe an C-6 steht das Verhalten des Ergostantriols bei der Blei-tetra-acetat-Titration nach Crigée in Übereinstimmung. Es verbraucht hierbei ein Atom Sauerstoff. Da die andere Doppelbindung im gleichen Ring in Konjugation zu der zwischen C-5 und C-6 liegt, ist damit die Konstitution des Ergosterins dem obigen Formelbild entsprechend bewiesen.

Ergosteryl-acetat: Schmp. 173°, -benzoat 163—65°, -isobutyrat Sintern 145°, Schmp. 162°. -palmitat Schmp. 107—08°, -allophanat Schmp. 250°. Windaus und Rygh, Nachr. Ges. Wiss. 1928, 202, -methyläther Schmp. 151—52°, -aethyläther Schmp. 123—24°. Heilbron, Soc. 1932, 268. -d-glucosid Schmp. 308°. -d-tetracetyl-glucosid Schmp. 167°. Am. Soc. 52, 2512 (1930).

Ergostanol: (in der Literatur auch als γ-Ergostanol, Allo-α-Ergostanol bezeichnet.) Entsteht durch Hydrierung von Ergosterin mit Pt oder PtO_2 in Äther oder Eisessig unter Zusatz von etwas HCl. Auch aus β-Ergostenol (s. u.). Schmp. 141°, $[\alpha]_D = +15{,}3°$. Acetat: Schmp. 144—45°, $[\alpha]_D = +6{,}3°$. α-Ergostanol ist ein unvollständig hydriertes Ergostanol.

[193]) Heilbron c. s., Soc. 1933, 302.

E r g o s t a n o n: Nadeln vom Schmp. 164°, $[\alpha]_D = +34,9°$, Oxim. Schm. 216°.

D i c a r b o n s ä u r e $C_{28}H_{48}O_4$: Schmp. 217—19°. $[\alpha]_D = +22,8°$. Dimethylester Schmp. 81—83°.

E p i - e r g o s t a n o l: Bei der katalytischen Hydrierung von Ergostanon in Äther neben Ergostanol. Liefert bei der Oxydation Ergostanon zurück, ist also an C-3 epimer zu Ergostanol. Nicht mit Digitonin fällbar. Schmp. 208°. $[\alpha]_D = +13,5°$. Acetat: Schmp. 144—45°.

E r g o s t a n. Blättchen vom Schmp. 84—85°. $[\alpha]_D = +17°$.

N o r - a l l o - c h o l a n s ä u r e: Gewonnen durch Oxydation des aus Allo-cholansäure-methylester gewonnenen Allo-cholyl-diphenyl-carbinol. Aus Aceton Nadeln vom Schmp. 170°. Methylester Nadeln vom Schmp. 79,5°.

E r g o s t e r i n - m a l e i n s ä u r e: Durch 8stündiges Erhitzen von Ergosterylacetat in Xylol mit Maleinsäureanhydrid auf 135°. Nach Abdestillation des Xylols und überschüssigen Maleinsäureanhydrids im Vakuum wird der Rückstand aus Äther zur Kristallisation gebracht. Derbe Blöcke vom Schmp. 216°. $[\alpha]_D = -19°$. Aus der Mutterlauge isomere Stoffe. I n h o f f e n, A. 508, 81 (1933).

α - D i h y d r o - e r g o s t e r i n (Dihydro-ergosterin I): Durch katalytische Hydrierung von Ergosterin mit Palladiummohr oder durch Hydrierung mit Natrium und Alkohol. Schmp. 173—74°. $[\alpha]_D = -21°$. Acetat: Schmp. 180—81°. $[\alpha]_D = -21°$. H e i l b r o n und S e x t o n, Soc. 1921, 924. v. R e i c h e l, H. 226, 146 (1934).

E r g o s t a - d i e n - t r i o l - m o n o b e n z o a t: Durch Addition von einem Mol Benzopersäure an Ergosterin. Nadeln aus Äther-Methanol, Schmp. 194°. $[\alpha]_D = +48,6°$. Daraus durch Verseifung: Ergosta-dien-triol: Schmp. 241—42°. $[\alpha]_D = +29,4°$. Diacetat: Schmp. 181—82°. Dibenzoat: Schmp. 225°. Durch katalytische Hydrierung des Diacetats entsteht

E r g o s t e n - t r i o l - d i a c e t a t: Rhomben vom Schmp. 172—73°, $[\alpha]_D = -9,75°$. Ergosten-triol: Aus Essigester Blättchen vom Schmp. 234°, $[\alpha]_D = -4,6°$. Durch Behandlung des Diacetats mit HCl entsteht Ergosten-triol-diacetat B: Schmp. 210—11°. $[\alpha]_D = +25,9°$.

Ergosten-triol B: Schmp. 191/93°.

Ergostan-triol-diacetat: Schmp. 190°, $[\alpha]_D = +6,5°$.

Ergostan-triol: Schmp. 247—48°.

Ergostan-dion-ol: Blättchen, Schmp. 262°, $[\alpha]_D = -26,6°$.

Ergosten-dion: gelbl. Blättchen, Schmp. 156°. $[\alpha]_D = -51,4°$.

Enol-äther des Ergosten-dions: Spieße vom Schmp. 161°.

Ergostan-dion: Schmp. 199°. Pyridazinderivat $C_{28}H_{46}N_2$: Nadeln vom Schmp. 210° unt. Zers.

U m w a n d l u n g s p r o d u k t e d e s E r g o s t e r i n s. 1. I s o m e r e d e s E r g o s t e r i n s

Nachdem erkannt worden war, daß die physiologisch wirksamen Bestrahlungsprodukte des Ergosterins Isomere dieses Sterins darstellen, sind große Bemühungen gemacht worden, auf chemischem Wege die Vorgänge der Lichtreaktion nachzuahmen, eine möglichst große Zahl

von Isomeren des Ergosterins darzustellen, um so vielleicht zu einem Stoff zu kommen, der die gleichen antirachitischen Wirkungen besitzt. Wie wir heute wissen (s. S. 299), spielt sich die photochemische Reaktion aber in einer so eigenartigen, spezifischen Weise ab, daß die Durchführung einer gleichen Umwandlung auf rein chemischem Wege als aussichtslos erscheinen muß, und damit wird nachträglich das negative Ergebnis dieses Arbeitsprogramms verständlich. Die Untersuchungen haben aber eine eingehende Kenntnis von der Chemie des Ergosterins gebracht, die vielleicht über das theoretische Interesse hinaus auch noch praktische Anwendungsmöglichkeiten eröffnen kann.

Die Methoden zur Isomerisierung des Ergosterins[104]) bestehen im wesentlichen in der Behandlung mit Chlorwasserstoff, die eine Verschiebung von Doppelbindungen bewirkt, in Hydrierungen, die durch Dehydrierung wieder rückgängig gemacht werden und umgekehrt in einer primären Dehydrierung, der sich eine Hydrierung anschließt. Durch Erhitzen mit Natriumaethylat kann außer einer Hydrierung gleichzeitig die sterische Umlagerung der Hydroxylgruppe erzielt werden; beim Erhitzen mit fein verteiltem Nickel wird die sekundäre Hydroxylgruppe zur Ketogruppe dehydriert und der verfügbar gewordene Wasserstoff sättigt eine Doppelbindung ab. Schließlich wurde auch eine Wasserabspaltung und Wiederanlagerung durchgeführt[105]). Mit Hilfe dieser Methoden, die sich bei den entstehenden Reaktionsprodukten nacheinander anwenden und miteinander kombinieren lassen, ist eine ganze Reihe von Ergosterin-Isomeren dargestellt worden, deren Zahl sich auch noch weiter vermehren ließe, wenn ein Bedürfnis bestünde.

Nach Windaus[104]) lassen sich die entstandenen Isomeren in drei Gruppen einteilen:

In die erste Gruppe gehören die Isomeren, die, wie das Ergosterin selbst, noch mit Digitonin schwerlösliche Additionsprodukte bilden: Ergosterin B_1, B_2, B_3, D, E, F und G (Ergosterin C ist wahrscheinlich ein Gemisch der B-Stoffe[106]). Diese Stoffe gehen bei der katalytischen Perhydrierung in Ergostanol über. Sie besitzen also das gleiche Kohlenstoffskelett wie das Ergosterin und unterscheiden sich von ihm nur durch die Lage der drei Doppelbindungen. Die eine der Doppelbindungen dürfte, wie in einigen Fällen nachgewiesen ist, noch zwischen

[104]) Windaus c. s., A. 488, 91 (1931), dort frühere Literatur. Dithmar und Achtermann, H. 205, 55 (1932).

[105]) Stoll, H. 202, 232 (1931).

[106]) Windaus und Rygh, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen 1928, 212.

C-22 und C-23 liegen, vielleicht hat aber eine cis-trans-Umlagerung an dieser Doppelbindung stattgefunden.

Nahe verwandt mit der ersten Gruppe sind die Stoffe der zweiten Gruppe. Sie unterscheiden sich zwar dadurch vom Ergosterin, daß sie mit Digitonin keine Anlagerungsverbindung geben, aber durch Behandlung mit Natriumaethylat bei 180° werden sie in Stoffe umgelagert, die zu der ersten Gruppe gehören und mit Digitonin fallen. Bei der Perhydrierung liefern sie das Epi-ergostanol, das sich nur durch die entgegengesetzte räumliche Lage der Hydroxylgruppe vom Ergostanol unterscheidet.

In die dritte Gruppe sind die Stoffe zu setzen, die weder durch Digitonin gefällt werden, noch durch Erhitzen mit Natriumaethylat diese Fähigkeit erlangen. Von den auf chemischem Wege dargestellten Isomeren gehören hierher die sog. u-Stoffe, die durch die Nickelerhitzung aus Dehydro-ergosterin darstellbar sind. Sie teilen diese Eigenschaft mit den meisten der photochemisch gebildeten Isomeren des Ergosterins, mit dem Vitamin D, dem Tachysterin und den beiden Suprasterinen. Doch gehen die Bestrahlungsprodukte durch katalytische Hydrierung in Perhydro-Derivate über, die von dem u-Ergostanol, dem Perhydrierungsprodukte der u-Stoffe, verschieden sind, so daß außer der erwähnten Gruppeneigenschaft wohl keine nähere Verwandtschaft anzunehmen ist.

In dem Übersichtsschema sind die wichtigsten Umwandlungen aufgezeichnet, die nach den oben erwähnten Methoden durchgeführt wurden. In dem Schema sind nur die Gruppen I und III vertreten, Gruppe II, Epi-Stoffe, läßt sich leicht von den einzelnen Stoffen der Gruppe I aus ergänzend einfügen.

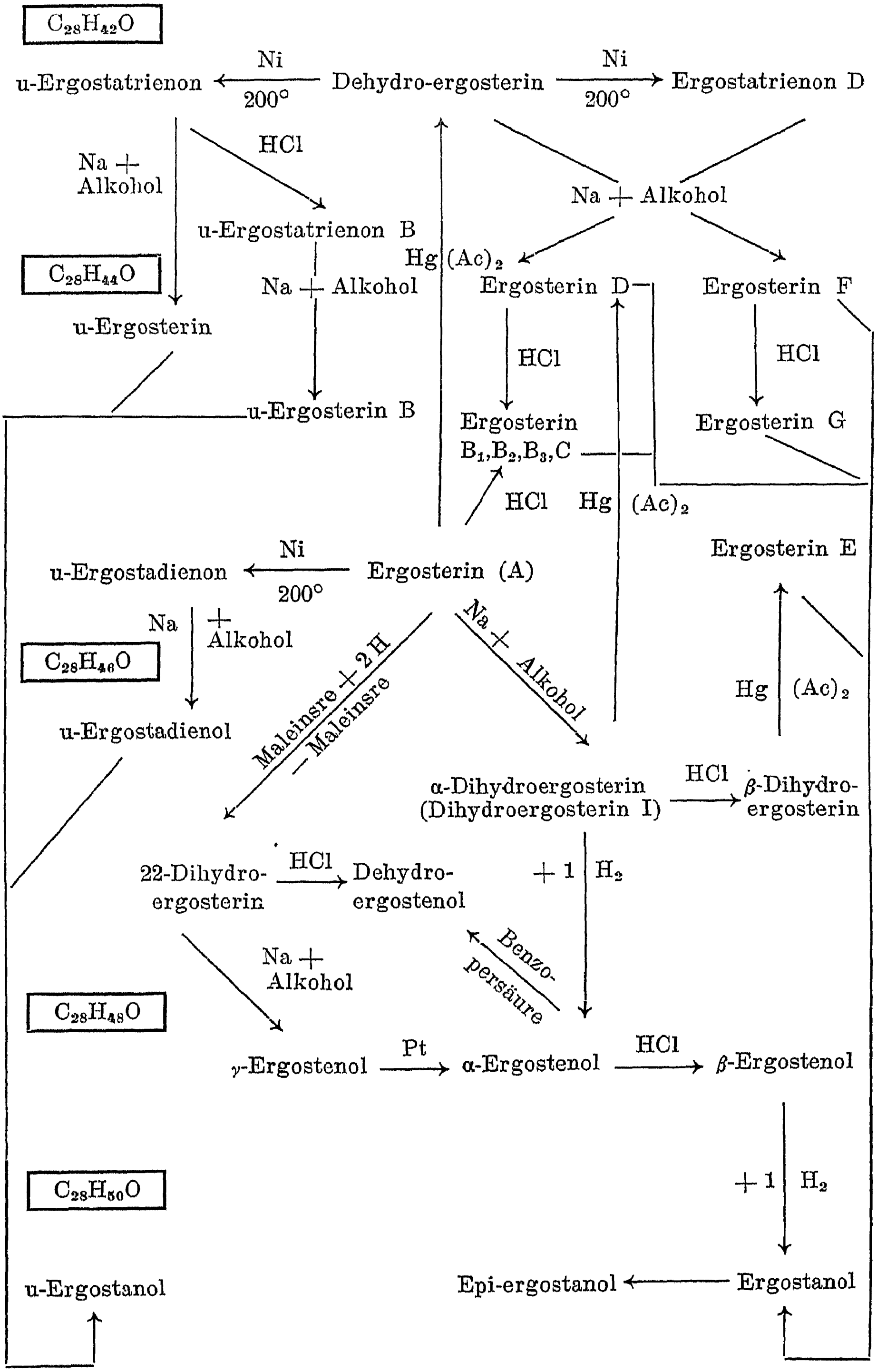
Dehydro-ergosterin: Darstellung durch Erhitzen von Ergosteryl-acetat in alkoholischer Lösung mit Merkuri-acetat. Aus verd. Alkohol Blättchen, aus Äther Nadeln vom Schmp. 146°. $[\alpha]_D = +149°$ (Chloroform). Acetat: Schmp. 146°, $[\alpha]_D = +149°$. Windaus und Linsert, A. 465, 157 (1928).

Dehydro-ergosterin-maleinsäure und ihre Beziehung zur Ergosterin-maleinsäure s. Windaus und Lüttringhaus, B. 64, 850 (1931). Honigmann, A. 508, 93 (1933).

Ergosterin F: Darstellung durch Hydrierung von Dehydro-ergosterin mit Natrium und Alkohol. Schmp. 150—51°. Acetat: Schmp. 152—53°. $[\alpha]_D = -23{,}5°$. A. 488, 91 (1931).

Ergosterin G: Ergosterin F-acetat wird in Chloroform mit HCl-Gas behandelt, daraus durch Verseifung dargestellt: Blättchen vom Schmp. 149—50°. $[\alpha]_D = -52{,}2°$. Acetat: Nadeln vom Schmp. 182°. Nakamiya, H. 203, 255 (1931).

Ergosterin D: Dehydro-ergosterin wird durch Erhitzung mit Nickel auf 200° umgelagert in Ergostatrienon D und u-Ergostatrienon, die durch


C28H42O
Ni
200°
u-Ergostatrienon
Dehydro-ergosterin
Ergostatrienon D
Na + Alkohol
HCl
u-Ergostatrienon B
Hg (Ac)2
C28H44O
Na + Alkohol
Ergosterin D
Ergosterin F
u-Ergosterin
u-Ergosterin B
Ergosterin B1,B2,B3,C
Ergosterin G
Ergosterin E
u-Ergostadienon
Ergosterin (A)
C28H46O
u-Ergostadienol
Maleinsre + 2 H
– Maleinsre
α-Dihydroergosterin (Dihydroergosterin I)
β-Dihydro-ergosterin
22-Dihydro-ergosterin
Dehydro-ergostenol
+ 1 H2
Benzopersäure
C28H48O
γ-Ergostenol
Pt
α-Ergostenol
β-Ergostenol
C28H50O
u-Ergostanol
Epi-ergostanol
Ergostanol

fraktionierte Kristallisation getrennt werden. Aus dem Trienon D (Schmp. 199—200°, Oxim 245°) durch Hydrierung mit Natrium und Alkohol entsteht Ergosterin D: Nadeln vom Schmp. 165—66°. Acetat: Schmp. 171°. $[\alpha]_D = +17,5°$. Windaus und Auhagen, A. 472, 185 (1929).

Darstellung aus α-Dihydro-ergosterin mit Merkuriacetat: Heilbron c. s., Soc. 1929, 2248.

u-Ergosterin: Durch Hydrierung des u-Ergostatrienons (Schmp. 130—31°) mit Natrium und Alkohol. Nadeln vom Schmp. 154°. $[\alpha]_D = +88°$. Acetat: Schmp. 151°. $[\alpha]_D = +103°$. A. 472, 185 (1929).

u-Ergosterin B: Auf gleiche Weise aus u-Ergostatrienon B (Schmp. 120°. Oxim 167°), das mit HCl aus u-Ergostatrienon entsteht. Schmp. 163—64°. $[\alpha]_D = -49,3°$. Acetat: Blättchen vom Schmp. 128°. Dithmar und Achtermann, H. 205, 63 (1932).

Ergosterine B: Entstehen durch Behandlung von Ergosterylacetat in Chloroform mit Chlorwasserstoffgas, und zwar als Hauptprodukt.

Ergosterin B_1: Nadeln vom Schmp. 148°, $[\alpha]_D = -40,3°$. Acetat: Schmp. 142°. $[\alpha]_D = -40,3°$.

Ergosterin B_2: Aus den Mutterlaugen von B_1 nach Behandlung mit Maleinsäureanhydrid. Schmp. 126°. $[\alpha]_D = -88,4°$. Acetat: Schmp. 100°, $[\alpha]_D = -80,4°$.

Ergosterin B_3 wird als Hauptprodukt erhalten, wenn bei der Reaktion und Aufarbeitung die Temperatur nicht über 0° steigt, solange noch Chlorwasserstoff vorhanden ist. Zwischen B_1 und B_3 besteht ein Gleichgewicht, das sich mit steigender Temperatur zugunsten von B_1 verschiebt. Nadeln vom Schmp. 136°. $[\alpha]_D = -190°$. Acetat: Schmp. 132°. $[\alpha]_D = -182,9°$. Alle B-Stoffe zeigen eine Absorptionsbande bei 248 mμ, sie sind nicht durch Natrium und Alkohol hydrierbar. Nur Ergosterin B_3 reagiert mit Maleinsäureanhydrid. Windaus c. s., A. 488, 91 (1931). Formulierung des Ergosterin B_3 s. M. Müller, H. 231, 75 (1935).

β-Dihydro-ergosterin: Aus α-Dihydro-ergosteryl-acetat durch Behandlung mit Chlorwasserstoff. Schmp. 124°. $[\alpha]_{5461} = -7°$. Acetat: Schmp. 108—09°. Heilbron c. s., Soc. 1929, 2248.

Ergosterin E: Mit Mercuriacetat aus β-Dihydro-ergosterin. Schmp. 124—25°. $[\alpha]_{5461} = -22,9°$. Acetat: Schmp. 119—20°. Soc. 1929, 2248.

Epi-Ergosterine: Durch Behandlung des entsprechenden Sterins mit Natrium-aethylat und Abtrennen des fällbaren Anteils als Digitonid.

Epi-ergosterin B_1: Schmp. 182—83°. Acetat: Schmp. 136°.

Epi-ergosterin B_2: Schmp. 163°. Acetat: Schmp. 127°.

Epi-ergosterin D: Schmp. 203—04°. $[\alpha]_D = +36,2°$. Acetat: Schmp. 150°. A. 488, 91 (1931).

2. Hydrierungsprodukte des Ergosterins.

Neben dem α- und dem β-Dihydro-ergosterin sind in der Literatur noch Dihydro-ergosterine II und III beschrieben. Dihydro-ergosterin II entsteht durch Erhitzen von Ergosterin mit Natriumaethylat bei 200°[197]). Möglicherweise ist es ein Dihydro-ergosterin I (α-), das

[197]) Windaus c. s., A. 488, 107 (1931).

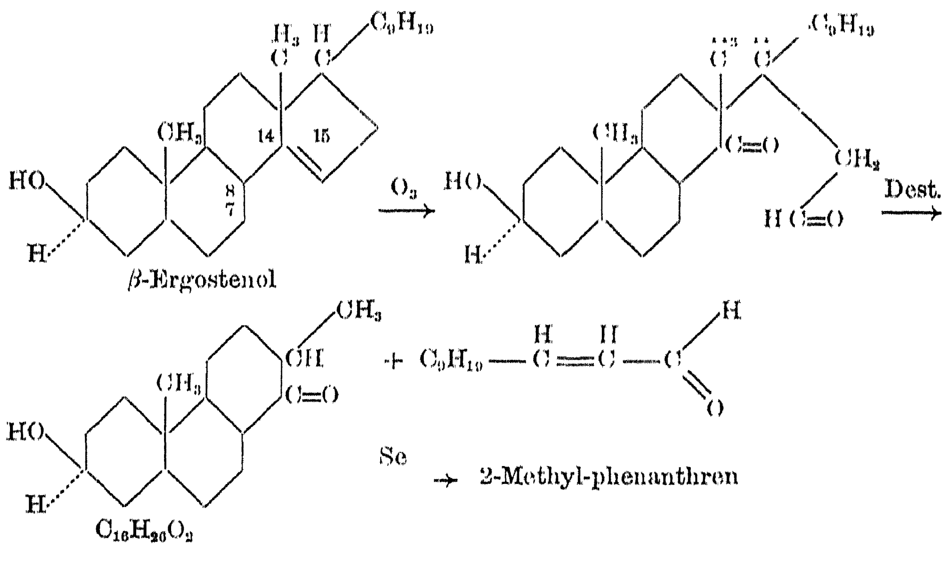
eine schwer abtrennbare, stärker drehende Verunreinigung enthält. Dihydro-ergosterin III ist wahrscheinlich mit β-Dihydro-ergosterin identisch[198]). Das von Heilbron und Mitarbeitern[199]) beschriebene γ-Dihydro-ergosterin ist als eine uneinheitliche Substanz erkannt worden: es ist eine Anlagerungsverbindung aus α-Dihydro-ergosterin und dessen Epi-Derivat im Verhältnis 1:1[200]). Durch die Nickelerhitzung bekommt man aus Ergosterin zweifach ungesättigte Ketone, darunter wieder einen u-Stoff, der sich durch Hydrierung in das u-Dihydro-ergosterin[201]) verwandeln läßt.

Das interessanteste Hydrierungsprodukt ist das 22-Dihydro-ergosterin[202]). Ergosteryl-acetat-maleinsäureanhydrid zerfällt bei etwa 230° wieder in seine Komponenten, Maleinsäureanhydrid und Ergosteryl-acetat. Hydriert man das Maleinsäure-Addukt mit Palladium und Wasserstoff, so nimmt es nur ein Mol Wasserstoff auf, und zwar in der Seitenkette des Moleküls. Bei der thermischen Zersetzung zerfällt dieses hydrierte Produkt in Maleinsäureanhydrid und das Acetyl-Derivat eines Stoffes $C_{28}H_{46}O$. Dieser Stoff unterscheidet sich nur dadurch vom Ergosterin, daß die Seitenkettendoppelbindung abgesättigt ist. Die charakteristische Konjugation im Ring B ist erhalten geblieben, und dadurch zeigt dieser Stoff in seinem ganzen Verhalten eine weitgehende Analogie mit dem Ergosterin. Das Ultraviolett-Absorptionsspektrum stimmt bis 240 mμ vollkommen überein, und auch die für Ergosterin typischen Isomerisierungsreaktionen lassen sich mit diesem Stoff durchführen. Er geht sogar durch die Einwirkung des ultravioletten Lichtes ebenfalls in einen antirachitisch wirksamen Stoff über. Durch Salzsäurebehandlung entsteht ein Isomeres, das mit dem aus α-Ergostenol dargestellten Dehydro-ergostenol identisch ist. Nur in einem Punkte besteht ein Unterschied: Hydriert man Ergosterin zuerst mit Natrium und Alkohol zum α-Dihydro-ergosterin und dann katalytisch, so erhält man das α-Ergostenol, ein Tetra-hydro-ergosterin. 22-Dihydro-ergosterin geht aber durch Hydrierung mit Natrium und Alkohol in ein isomeres Tetrahydro-ergosterin, das γ-Ergostenol über; d. h. die Anwendung der gleichen Hydrierungsarten in verschiedener Reihenfolge läßt verschiedene Stoffe entstehen. In Berührung mit einem Platinkatalysator lagert sich das γ-Ergostenol aber in den α-Stoff um, und entsprechend

198) Dithmar und Achtermann, H. 205, 62 (1932).
199) Soc. 1929, 2248.
200) Lettré, H. 189, 1 (1930).
201) Windaus und Auhagen, A. 472, 185 (1929).
202) Windaus c. s., A. 508, 105 (1933).

bekommt man bei der katalytischen Hydrierung des 22-Dihydro-ergosterins auch direkt zum α-Ergostenol.

Das α-Ergostenol ist außerordentlich schwer hydrierbar, erst nach einer Isomerisierung durch Salzsäure, die zum β-Ergostenol führt[203]), läßt sich die dritte Doppelbindung nun auch leicht katalytisch hydrieren. Die Lage der Doppelbindung im β-Ergostenol ist durch Untersuchungen von Achtermann[204]) und von Laucht[205]) im Göttinger Laboratorium sicher festgelegt worden. Durch Ozonisierung, reduktive Aufspaltung des Ozonids und Destillation (= thermische Zersetzung) des neutralen Anteils wurde ein Keto-alkohol $C_{16}H_{26}O_2$ und ein ungesättigter Aldehyd $C_{12}H_{22}O$ (als Semicarbazon) gefaßt. Der Keto-alkohol ging durch Selendehydrierung in 2-Methyl-phenanthren über. Damit ist die von Achtermann[204]) angegebene Formulierung dieses Abbaus bewiesen, und die Lage der Doppelbindung im β-Ergostenol zwischen C-14 und C-15 festgelegt. Für das α-Ergostenol ist die Doppelbindung zwischen C-8 und C-14 anzunehmen. Diese Lage zwischen zwei tertiären C-Atomen erklärt die schwere Hydrierbarkeit. Im γ-Ergostenol liegt die Doppelbindung dann wahrscheinlich zwischen C-7 und C-8. Da α-Dihydro-ergosterin auch durch katalytische Hydrierung aus Ergosterin entsteht[206]), muß man annehmen, daß die dem Übergang γ- in α-Ergoste-



[203]) Heilbron c. s., Soc. 1932, 1708.

[204]) H. 225, 141 (1934).

[205]) H. 237, 236 (1935).

[206]) Heilbron und Sexton, Soc. 1929, 924. v. Reichel, H. 226, 146 (1934).

nol entsprechende Verschiebung der Doppelbindung auch schon bei der Hydrierung des Ergosterins mit Natrium und Alkohol spontan vor sich geht, ein Befund, der eine eigentümliche Beeinflussung eines Reaktionsverlaufs durch eine vom reagierenden Teil des Moleküls weit entfernte Doppelbindung aufdeckt.

u-Ergosta-dienol: Nadeln vom Schmp. 170°. $[\alpha]_D = +42°$. Acetat: Schmp. 128°. $[\alpha]_D = +58°$.

u-Ergostanol: Nadeln Schmp. 184°. $[\alpha]_D = +34°$. Acetat: Schmp. 96°. $[\alpha]_D = +39°$. A. 472, 185 (1929).

22-Dihydro-ergosteryl-acetat-maleinsäure-anhydrid: Gallertig, sintert bei 172—74°, schmilzt bei 202—03°. Inhoffen, A. 508, 81 (1933). Über die Ozonisierung s. Windaus und Inhoffen, A. 510, 260 (1934).

22-Dihydro-ergosterin: Acetat: Schmp. 157—58°, $[\alpha]_D = -74{,}8°$. Daraus der freie Alkohol: Schmp. 152—53°. $[\alpha]_D = -109°$.

γ-Ergostenol: Nadeln vom Schmp. 145—46°. $[\alpha]_D = 0°$.

Dehydro-ergostenol: Acetat: Schmp. 135°. $[\alpha]_D = -29{,}3°$. Schmp. 141°. $[\alpha]_D = -18{,}2°$. Windaus und Lüttringhaus, A. 481, 119 (1930).

β-Ergostenol: Schmp. 141—42°. $[\alpha]_D = +19{,}4°$. Acetat: Schmp. 111—12°. $[\alpha]_D = +13{,}1°$. Benzoat: Schmp. 158—60°.

3. Photochemische Oxydationsprodukte

Eine der interessantesten Reaktionen des Ergosterins ist das Verhalten im Sonnenlicht bei Abwesenheit von Sauerstoff und Anwesenheit von organischen Farbstoffen[207]), die zugleich als Sensibilisatoren und als Dehydrierungsmittel wirken. Als solche sind Eosin und Erythrosin sehr gut verwendbar, Chlorophyll und Methylenblau weniger geeignet. Es spielt sich folgende Reaktion ab: 2 Moleküle Ergosterin gehen unter Abgabe von 2 Atomen Wasserstoff in ein dimolekulares Produkt über; der Wasserstoff wird nicht als solcher frei, sondern von dem Farbstoff, der in seine Leukoform übergeht, aufgenommen. $2\, C_{28}H_{44}O = C_{56}H_{86}O_2 + 2\, H$.

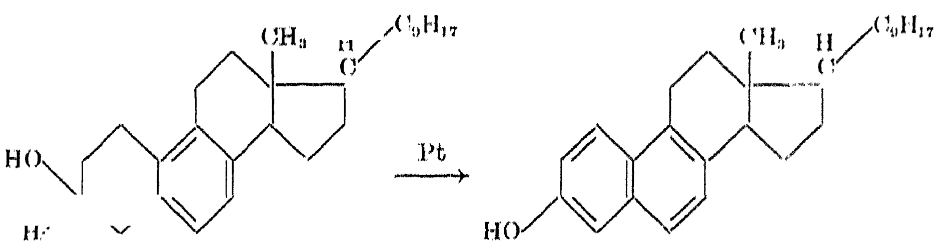
Dieses dimolekulare Produkt ist in den meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich und läßt sich durch seine Ausscheidung aus dem Reaktionsgemisch leicht isolieren. Es ist in der Literatur als „Pinakon" bezeichnet worden, doch spricht hiergegen der Befund, daß es sich durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin in ein Acetat verwandeln läßt[208]). Als Pinakon sollte es zwei tertiäre und infolgedessen schwer veresterbare Hydroxyle enthalten. Über seinen Aufbau haben wir

[207]) Windaus und Borgeaud, A. 460, 235 (1928).

[208]) Unveröffentl. Versuche von Windaus, Inhoffen und Buchholz.

noch keine nähere Kenntnis. Besser untersucht ist die eigenartige Umwandlung, die es beim Kochen mit Essigsäureanhydrid oder beim Erhitzen erfährt. Es spaltet hierbei glatt Methan ab[209]) und zerfällt gleichzeitig in einen Stoff von der halben Molekülgröße, den man „Neo-ergosterin" genannt hat[207]) [210]). Dieser Stoff hat, wie sorgfältige Analysen ergaben, die Zusammensetzung $C_{27}H_{40}O$. Er unterscheidet sich also durch einen Mindergehalt von einem Molekül Methan vom Ergosterin. Diese glatte Abspaltung von Methan, die keine Analogien in der organischen Chemie hat, läßt eine nähere Untersuchung des Aufbaus des „Pinakons" und des Reaktionsmechanismus erwünscht erscheinen.

Durch die Methanabspaltung ist der Ring B des Ergosterins völlig aromatisch geworden. Beweis: Das Absorptionsspektrum des Neo-ergosterins entspricht dem aromatischer Verbindungen; nur eine der vorhandenen Doppelbindungen ist durch katalytisch erregten Wasserstoff oder durch Benzopersäure nachweisbar und bei der Oxydation des Neo-ergosterins mit Salpetersäure bildet sich Benzoltetracarbonsäure[209]), während aus Ergosterin ein Homologes entsteht. Zugleich ist das quartäre C-Atom 10 tertiär geworden und damit fällt die Hinderung, die die anderen Ergosterin-Derivate der Dehydrierung mit Platin entgegensetzen. Neo-ergosterin geht bei dieser Reaktion glatt in ein Derivat des β-Naphtols über[211]), ein Produkt, das durch seinen ähnlichen Aufbau wie das Equilenin Interesse hat, und das auch tatsächlich eine östrogene Wirkung besitzt.



Neo-ergosterin Dehydro-neo-ergosterin

Die Reaktion des Ergosterins im Licht verläuft aber anders, wenn bei der Anwesenheit von sensibilisierenden Stoffen der Sauerstoff Zutritt hat und wenn man diesen Zutritt noch begünstigt. Ergosterin und seine Ester gehen hierbei in sehr schön kristallisierte Peroxyde über[212]), die relativ beständig sind. Aus angesäuerter Jodid-Lösung machen sie Jod

209) Inhoffen, A. 497, 130 (1932).
210) Bonstedt, H. 185, 165 (1929).
211) Honigmann, A. 511, 292 (1934).
212) Windaus und Brunken, A. 460, 227 (1928).

frei. Durch Zinkstaub und Alkali wird das Ergosterin-peroxyd zu einem Ergosta-dien-triol $C_{28}H_{46}O_3$ reduziert[213]). Durch Erhitzen mit Maleinsäure-anhydrid lagert sich dieser Stoff in einen isomeren um[214]), der mit dem aus Ergosterin und Benzopersäure dargestellten Dien-triol identisch ist. Da für dieses durch die Untersuchungen von Windaus festgestellt ist, daß die Hydroxyle sich an C-3, 5 und 6 befinden, kann die gleiche Stellung der Hydroxyle auch für das erstgenannte Triol angenommen werden[214])[215]). Durch die Wirkung des Maleinsäure-anhydrids ist eine Umlagerung eines cis-Glykols in die trans-Form bewirkt worden, so daß daraus weiter eine 1,2-Addition des Sauerstoffs bei der Peroxydbildung zu folgern ist. Für das Peroxyd des Dehydro-ergosterins hat M. Müller[215]) eine 1,4-Addition des Sauerstoffmoleküls sicher beweisen können. Es bleibt noch zu erwähnen, daß das 22-Dihydro-ergosterin ganz entsprechend ein dimolekulares Dehydrierungsprodukt und ein kristallisiertes Peroxyd bildet.

Ergopinakon $C_{56}H_{86}O_2$: lange filzige Nadeln, die bei 202—03° unt. Zers. schmelzen. $[\alpha]_D = -209°$ (Pyridin).

Neo-ergosterin: Prismen vom Schmp. 151—52°. Acetat: Schmp. 122—23°. Dibromid: Nadeln, Schmp. 212° unt. Zers. Acetat-dibromid: Schmp. 183°.

Ergosterin-peroxyd: Schmp. 178°. $[\alpha]_D = -35,7°$. Acetat: Schmp. 202°. $[\alpha]_D = -17,9°$. Therm. Zersetzung s. Windaus c. s., A. 472, 195 (1929).

Dien-triol aus dem Peroxyd: Schmp. 227° unt. Zers. $[\alpha]_D = -13,3°$.

A IV e. Enthalten Bakterien Sterine?

Eine große Zahl von Untersuchungen haben diese Frage verneinend beantwortet. In Diphtherie- und Tuberkelbazillen, Bacillus Calmette-Guérin (BCG), Bact. coli und Mycobacterium lacticola[216]) konnten keine Sterine aufgefunden werden. Windaus (unveröffentlicht) fand, daß Bakterienfette durch Bestrahlung nicht antirachitisch aktivierbar waren. Die Auffindung von Cholesterin im Neutralfett von Lactobacillus acidophilus[217]) bringt keinen Beitrag zur Klärung der Frage, da das Chole-

[213]) Windaus und Linsert, A. 465, 156 (1928).

[214]) Achtermann, H. 217, 281 (1933).

[215]) H. 231, 75 (1935).

[216]) Hammerschlag, Mh. f. Ch. 10, 9 (1889). Tamura, H. 87, 85 (1913), 89, 289 (1914). Goris, Ann. Inst. Pasteur 39, 497 (1920). Anderson c. s., J. biol. Chem. 84, 703 (1929), 83, 505 (1929), 94, 451 (1931), 98, 43 (1932). Beumer u. Hepner, Z. f. exp. Med. 64, 787 (1929). v. Behring, H. 192, 112 (1930). Chargaff, H. 217, 115 (1933), 218, 223 (1933).

[217]) Crowder u. Chargaff, J. biol. Chem. 104, 399 (1934).

sterin in diesem Falle aus dem Kulturmedium stammen kann. Anfang 1935 berichtete E. Hecht[218]) über seine Untersuchungen über den Steringehalt von Bakterien und gab an, durch Digitoninfällung und Farbreaktionen das Vorhandensein von Sterinen nachgewiesen zu haben. In einer Nachprüfung dieser Befunde, die im Hinblick auf Bilanzversuche, bei denen etwa selbstgebildete Sterine der Darmflora störend wirken können, sehr wesentlich ist, kamen Anderson, Schönheimer, Crowder und Stodola[219]) zu einem negativen Ergebnis. Die Forscher halten die Anwesenheit von Sterinen in Bakterien für ausgeschlossen.

Die Bedeutung der negativen Befunde faßt v. Behring dahin zusammen, daß „damit zugleich bewiesen ist, daß die Sterine keine fundamental wichtigen Stoffe sind, sondern erst im Laufe der phylogenetischen Entwicklung(allerdings schon früh, denn die Hefe enthält bereits Sterine) auftreten. Man könnte daraus schließen, daß die Sterine im Zusammenhang mit Funktionen stehen, die erst später erworben werden." Nach dem bisher vorliegenden Material treten Sterine erst in einer Zelle mit entwickeltem Zellkern auf. Ob damit ein innerer Zusammenhang ausgedrückt wird oder nur eine zufällige Parallele, sei dahingestellt.

A V. Die Gallensäuren

AVa. Die gepaarten und spezifischen Gallensäuren

Schon oben war erwähnt worden, daß die Gallensäuren nicht in freier Form vorkommen, sondern mit Glykokoll oder Taurin gekuppelt als Natriumsalze vorliegen. In wenigen Fällen wurde bisher das Auftreten von ungepaarten Gallensäuren beobachtet: bei einem Fall von menschlicher Gallenfistel mit biliärer Zirrhose der Leber konnten aus der Galle große Mengen freier Gallensäuren isoliert werden[1]). Die Trioxybufo-sterocholensäure (s. u.) wurde ungepaart in der Krötengalle aufgefunden.

Die naheliegende Annahme, daß in den gepaarten Säuren eine säureamidartige Verknüpfung der Gallensäure mit der Aminogruppe der anderen Komponente vorliegt, konnte im Fall der Cholsäure durch die Synthese bewiesen werden. Bondi und Müller[2]) setzten das Azid der Cholsäure, das nach den üblichen Methoden aus Ester und Hydrazid dargestellt wurde, in alkalischer Lösung mit Glykokoll oder Taurin um.

[218]) H. 231, 29 und 279 (1935).
[219]) H. 237, 40 (1935).
[1]) Schönheimer, H. 208, 182 (1932).
[2]) H. 47, 499 (1906).

Cortese und Baumann[3]) beschreiben eine ergiebigere Methode: es gelang ihnen, aus der Triformyl-cholsäure deren Säurechlorid darzustellen, das sich in alkalischer Lösung mit Glykokoll zur Glykocholsäure umsetzt. Die durch Synthese gewonnene Glykocholsäure stimmt in allen Eigenschaften mit dem im Organismus vorkommenden Produkt überein, doch sind bei der Tauroverbindung geringe Unterschiede vorhanden[5]). Die von Hammarsten[4]) als Taurocholsäure beschriebene Substanz soll nach neueren Untersuchungen[5]) deren Natriumsalz darstellen, obschon die Ausfällung aus stark saurer Lösung vorgenommen wird; auch in dem synthetischen Produkt dürfte dann das Natriumtaurocholat vorliegen. Die eigentliche freie Taurocholsäure läßt sich auf dem Umweg über das Bariumsalz gewinnen[6]).

Wieland[7]) hat aus der Desoxycholsäure nach der Azidmethode kristallisierte Glyko- und Tauro-desoxycholsäuren dargestellt, in denen also eine säureamidartige Verknüpfung der Komponenten vorhanden ist. Der synthetischen Glyko-desoxycholsäure fehlt jedoch die Fähigkeit, mit Fettsäuren eine Choleinsäure zu bilden wie die freie Desoxycholsäure (s. u.). Die Existenz einer Glyko-choleinsäure ist durch Wahlgren[8]), der sie aus Rindergalle isolieren konnte, erwiesen. Es ist demnach möglich, daß in der natürlichen Glykodesoxycholsäure eine andersartige Kombination vorliegt, etwa Veresterung der Carboxylgruppe des Glykokolls mit einem Hydroxyl der Desoxycholsäure. Die Stickstoffbestimmung nach van Slyke könnte eine Entscheidung bringen, sie müßte bei der natürlichen Glyko-desoxy-choleinsäure unter dieser Annahme den Stickstoff erfassen. In einer gepaarten Säure mit Säureamidbindung läßt er sich, wie es im Fall der Nutria-glycocholsäure gezeigt wurde[9]), erst nach der Verseifung nachweisen.

Die Mengenverhältnisse, in denen Glykokoll und Taurin als Partner in den gepaarten Gallensäuren nebeneinander vorkommen, schwanken stark. Bei den Carnivoren, Vögeln, Schlangen und Fischen überwiegt die Tauro-Verbindung, doch enthält auch die Galle des Pflanzenfressers (Ziege und Schaf) die Taurocholsäure, so daß der Einfluß der Nahrung nicht ganz eindeutig zu ersehen ist. Die Glykocholsäure läßt sich leicht

[3]) Am. Soc. 57, 1393 (1935).
[4]) H. 43, 127 (1904).
[5]) Tanaka, H. 220, 39 (1933).
[6]) Kazuno, H. 224, 160 (1934).
[7]) H. 106, 181 (1919).
[8]) H. 36, 556 (1902).
[9]) H. 220, 106 (1933).

aus Rindergalle gewinnen, das beste Ausgangsmaterial für die Darstellung der Taurocholsäure ist die Hundegalle[10]).

Die verschiedenen spezifischen Gallensäuren. Die schon oben besprochenen spezifischen Gallensäuren Cholsäure und Desoxycholsäure kommen in großer Menge in der Rinder- und in der Menschengalle vor. In dem gleichen Material finden sich neben ihnen die Lithocholsäure und die Cheno-desoxycholsäure (Anthropo-desoxycholsäure). Diese wurde auch in Form einer Molekülverbindung (Weyland-Säure), die sie mit der 3-Oxy-12-keto-cholansäure bildet, isoliert[11]). Die Cholsäure wurde weiter in der Galle des Schafes[12]), der Ziege[13]), des Hammels[14]), der Antilope[15]), des Moschusochsens[16]), des Kaninchens[17]), des Löwen[18]) und des Hundes[19]) aufgefunden. Ferner ließ sie sich aus der Galle von Fischen (Dorsch[19]), Kabeljau, Steinbutt, Hecht, Barsch[20]), Scomberomus Niphonius[21]) und anderen[17])) und Schlangen (Bothrops alternata, Crotalus terrificus[22])) gewinnen.

Die Desoxycholsäure kommt neben der Cholsäure in den Gallen der aufgezählten Pflanzenfresser vor. Bei Kaninchen- und Hasengalle konnte ein Überwiegen der Desoxycholsäure festgestellt werden[17])[15]). Außer der schon oben beschriebenen Hyodesoxycholsäure konnte aus der Schweinegalle noch die 3-Oxy-6-keto-allocholansäure isoliert werden[23]). Die Chenodesoxycholsäure dürfte für den Vogelorganismus charakteristisch sein, sie wurde bis jetzt aus der Gänse- und Hühnergalle isoliert[24]).

Die β-Phocae-cholsäure. In der Galle des Walrosses und einiger Seehundarten hat O. Hammarsten[25]) zwei neue charakteristische Taurocholsäuren aufgefunden, die bei der Verseifung zwei spezi-

[10]) S. [4]) und Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. (Abderhalden) I, 6, 219 (1922).
[11]) Wieland und Kishi, H. 214, 47 (1933).
[12]) Schenk, H. 148, 218 (1925).
[13]) Schenk, H. 145, 93 (1925).
[14]) A. 70, 179 (1849).
[15]) Windaus und van Schoor, H. 173, 320 (1928).
[16]) Hammarsten, H. 43, 109 (1904).
[17]) Okamura und Okamura, H. 188, 11 (1930).
[18]) Tanaka, H. 213, 199 (1932).
[19]) Hammarsten, H. 43, 127 (1904).
[20]) A. 70, 169 (1849).
[21]) H. 224, 162 (1934).
[22]) Deulofeu, H. 229, 157 (1934).
[23]) Fernholz, H. 232, 202 (1935).
[24]) H. 157, 177 (1926), 161, 143 (1926).
[25]) H. 61, 454 (1909), 68, 109 (1910).

fische Gallensäuren, die α- und die β-Phocaecholsäure, liefern. Die Mengenverhältnisse an α- und β-Säure schwanken je nach dem Ausgangsmaterial, in der Walroßgalle überwiegt die α-Säure, während Windaus und van Schoor[26]) aus Seehundsgalle im wesentlichen die β-Säure isolieren konnten. Während die Zusammensetzung der α-Phocae-cholsäure noch nicht sicher festgelegt ist (vielleicht $C_{22}H_{36}O_5$), ist die der β-Säure einwandfrei zu $C_{24}H_{40}O_5$ ermittelt. Sie ist also mit der Cholsäure isomer, und Hammarsten hat sie daher auch Isocholsäure genannt.

Zur Darstellung der β-Phocaecholsäure wird schleimfreie Seehundsgalle mit 10proz. Kalilauge gekocht. Die durch Ansäuern ausgeschiedene Masse wird in 90proz. Alkohol gelöst und zur Entfernung von Fettsäuren mit Petroläther ausgeschüttelt. Die Alkohol-Lösung wird eingedampft und der Rückstand in Ammoniak gelöst. Nach einer Verteilung der Produkte zwischen Äther und Ammoniak, wird aus der Lösung der Ammonium-Salze der β-Phocae-cholsäure das schön kristallisierte Bariumsalz ausgefällt. Aus ihm stellt man über das Natriumsalz die freie Säure dar. Sie wird aus Aceton umkristallisiert und bildet weiße Blättchen, die bei 222° schmelzen. Die Säure gibt keine Jodreaktion und keine Färbung mit konz. Salzsäure. Ihr Geschmack ist rein bitter. Sie bildet ein schwer lösliches, in Nadeln kristallisierendes Natriumsalz.

Windaus und van Schoor gelang es, auch bei dieser Gallensäure die Beziehung zu den Gallensäuren der höheren Wirbeltiere herzustellen. Bei der Oxydation mit Permanganat geht die β-Phocaecholsäure in eine Dioxymonocarbonsäure mit 23 C-Atomen $C_{23}H_{38}O_4$ über. Diesen Verlust von einem C-Atom bei der Oxydation kann man nur so deuten, daß in dem Ausgangsmaterial eine α-Oxy-Säure vorliegt, die zu der nächst niederen Carbonsäure abgebaut wurde. Durch Dehydrierung mit Chromsäure entsteht zunächst aus der Dioxysäure eine Diketosäure, die bei der Clemmensenreduktion in eine gesättigte Monocarbonsäure $C_{23}H_{38}O_2$, die von Wieland dargestellte Norcholansäure übergeht.

$$C_{21}H_{35}O_2{-}CH_2{-}\overset{H}{\underset{OH}{C}}{-}COOH \longrightarrow C_{21}H_{35}O_2{-}CH_2{-}COOH \longrightarrow$$

$$C_{21}H_{31}O_2{-}CH_2{-}COOH \longrightarrow C_{21}H_{35}{-}CH_2{-}COOH = \text{Nor-cholansäure.}$$

Die β-Phocae-cholsäure ist demnach eine Cholansäure, die ein Hydroxyl an C-23, in α-Stellung zur Carboxylgruppe trägt. Über die Lage der beiden anderen Hydroxyle kann man nur eine wahrscheinliche Aussage machen: Durch Einwirkung von Hypobromit geht die β-Phocaecholsäure in eine Oxy-lacton-dicarbonsäure $C_{24}H_{36}O_7$ über. Diese Bil-

[26]) H. 173, 312 (1928).

dung einer Lactonsäure erinnert an das Verhalten der Cholsäure und Cheno-desoxycholsäure dem gleichen Oxydationsmittel gegenüber (s. S. 76). Man kann also die wahrscheinliche Annahme machen, daß die beiden anderen Hydroxyle hier ebenfalls an den C-Atomen 3 und 7 stehen (s. Übersichtstafel I). Die völlige Sicherstellung der Formel konnten Windaus und van Schoor aus Materialmangel nicht mehr vornehmen.

Säure $C_{23}H_{38}O_4$. Darst. durch Oxydation von β-Phocaecholsäure mit Permanganat in Acetonlösung. Aus Alkohol lange Nadeln vom Schmp. 197°. Methylester: aus Methanol Nadeln vom Schmp. 78°. Säure $C_{23}H_{34}O_4$. Aus verd. Alkohol lange Nadeln vom Schmp. 200°. Oxy-lactondicarbonsäure $C_{24}H_{36}O_7$. Aus verd. Eisessig derbe Prismen vom Schmp. 237° (nach dem Trocknen im Vakuum bei 100°).

Die Urso-desoxycholsäure[27]). Aus der Eisbärengalle konnte eine Gallensäure gewonnen werden, die mit der Desoxycholsäure isomer ist und den Namen Ursodesoxycholsäure bekommen hat. Sie liegt in der Galle als Tauro-Verbindung vor. Die Säure enthält zwei sekundäre Hydroxyle, die sich durch Chromsäureoxydation leicht dehydrieren lassen. Die entstandene Dehydro-urso-desoxy-cholsäure liefert bei der Clemmensenreduktion eine von der Cholansäure verschiedene „Ursocholansäure“ $C_{24}H_{40}O_2$. Um so merkwürdiger ist es, daß man die Ursodesoxybiliansäure, eine Ketotricarbonsäure $C_{24}H_{36}O_7$, durch die gleiche Reduktion in ein Cholansäurederivat, die Lithobiliansäure, verwandeln kann. Immerhin ist aber damit auch diese Säure in Beziehung zu den anderen bekannten Gallensäuren gebracht worden. Worin der Unterschied der Ursocholansäure gegenüber der Cholansäure besteht, ist aus dem vorhandenen experimentellen Material nicht zu ersehen.

Urso-desoxycholsäure: Aus verd. Alkohol Tafeln vom Schmp. 198/200°. $[\alpha]_D = +44{,}5°$. Dehydro-säure: Blättchen vom Schmp. 161°. $[\alpha]_D = -33°$. Ursocholansäure: Nadeln vom Schmp. 153°. $[\alpha]_D = -38{,}1°$, Aethylester Nadeln vom Schmp. 110°.

Ursodesoxy-biliansäure: Tafeln vom Schmp. 230/32°.

Weniger gut sind unsere Kenntnisse von dem Aufbau der Bufodesoxycholsäure[28]) und der Nutria-cholsäure. Die Bufodesoxycholsäure wurde aus der Galle von Bufo vulgaris japonica in amorpher Form isoliert. Sie kommt wahrscheinlich als Taurin-Verbindung vor. Gut kristallisiert ist die aus ihr dargestellte α-Dehydro-bufo-

[27]) Hammarsten, H. 36, 537 (1902). Shoda, C. 1928 II, 679. Kaziro, H. 185, 151 (1929), 197, 206 (1931).

[28]) Okamura, C. 1928 I, 2624, 1929 I, 1113, 1930 I, 1310.

desoxycholsäure (Schmp. 230°). Durch Erhitzen mit Eisessig-Salzsäure lagert sie sich in die isomere β-Säure (Schm. 251°) um. Beide Säuren gehen durch Clemmensenreduktion in die Bufocholansäure, ein Isomeres der Cholansäure, über. Aus der α-Säure wurde durch Oxydation mit Hypobromit eine Keto-tricarbonsäure $C_{24}H_{36}O_7$ erhalten, die durch Clemmensenreduktion und anschließende Umlagerung mit Alkali in eine Tricarbonsäure $C_{24}H_{38}H_6$ übergeht, die vielleicht mit Allo-lithobiliansäure identisch ist.

Bufocholansäure: Schmp. 236°. $[\alpha]_D = -20{,}27°$.

Die Nutria-cholsäure wurde von Brigl und Benedict[29]) in der Galle des Sumpfbibers und in einem Magenstein als Glyko-Verbindung aufgefunden. Durch Hydrolyse wurde daraus die freie Säure $C_{24}H_{40}O_5$, z. T. in kristallisierter Form, erhalten. Schmp. 198°. Die Säure gibt die Pettenkofersche Reaktion, aber keine Reaktion nach Mylius oder Hammarsten.

AVb. Das Choleinsäureprinzip und die biologische Bedeutung der Gallensäuren

Weitaus die meisten organischen Molekülverbindungen enthalten ihre Komponenten im Verhältnis 1 : 1 oder 1 : 2. In den Choleinsäuren hat man aber eine sehr viel kompliziertere und mannigfaltigere Art des Aufbaues feststellen können. Zur Entdeckung der Choleinsäuren sind Wieland und Sorge[30]). wie oben schon kurz erwähnt wurde, auf folgendem Wege gekommen: Aus Rindergalle waren neben der Cholsäure zwei weitere hydroxyl-ärmere Säuren isoliert worden. Zunächst gewann Latschinoff[31]) im Jahre 1885 die sog. Choleinsäure, der er die Zusammensetzung $C_{24}H_{40}O_4$ zuschrieb. Ein Jahr später isolierte Mylius[32]) eine Säure von der gleichen Zusammensetzung, die Desoxycholsäure. Latschinoff hielt diese Säure zunächst für identisch mit seiner Choleinsäure und glaubte, daß sie sich lediglich durch Kristallwassergehalt voneinander unterschieden, obschon es ihm nicht gelang, die beiden Säuren ineinander überzuführen. Im Verlauf der weiteren Untersuchung[33]) mußte man jedoch zu der Überzeugung kommen, daß es sich hier um definierte Individuen handelt, wie aus der folgenden Gegenüberstellung der Eigenschaften der Stoffe deutlich zu erkennen ist:

[29]) H. 220, 106 (1933).
[30]) H. 97, 1 (1916).
[31]) B. 18, 3039 (1885).
[32]) B. 19, 374 (1886).
[33]) Pregl, H. 65, 157 (1910). Langheld, B. 41, 378 (1908).

	Choleinsäure	Desoxycholsäure
Schmelzpunkt:	186—88°	172—73°
Kristallform:	rhombisch	tetragonal
Löslichkeit in Alkohol heiß:	1 : 5	1 : 2
„ „ „ kalt:	1 : 18	1 : 4
Eisessig kalt:	leichtlöslich	schwerlöslich
Spez. Drehung:	+ 48,28	+ 57,02

Durch Erhitzen im Vakuum oder durch Einwirkung von Natriumaethylat oder durch Kochen mit Xylol konnten Wieland und Sorge aus der Choleinsäure Desoxycholsäure gewinnen oder aus beiden identische Reaktionsprodukte erhalten. Daneben wurde stets aus der Choleinsäure eine kleine Menge (6—8%) einer bei 58° schmelzenden gesättigten Fettsäure erhalten, die in ihrer Zusammensetzung der Margarinsäure $C_{17}H_{34}O_2$ entsprach. Zunächst könnte man die Möglichkeit diskutieren, daß in der Choleinsäure diese Fettsäure irgendwie chemisch an Desoxycholsäure gebunden ist. Hiergegen spricht aber die leichte Abspaltbarkeit der Fettsäure und vor allem das eigenartige Verhältnis, in dem die Fettsäure in der Choleinsäure enthalten ist: auf ein Molekül Fettsäure kommen acht Moleküle Desoxycholsäure. Diese eigentümliche Zusammensetzung macht es auch verständlich, daß man die beiden Stoffe zunächst als Isomere angesehen hat. Für die Desoxycholsäure berechnet sich ein C-Gehalt von 73,41 und H = 10,28, für die Choleinsäure (8 Desoxycholsäure und 1 $C_{17}H_{34}O_2$) C = 73,63 und H = 10,39, also Werte, die die Elementaranalyse nicht zu unterscheiden vermag. Die Annahme, daß es sich um eine Anlagerungsverbindung handele, konnte Wieland und Sorge durch die Synthese der Choleinsäure aus den äquivalenten Mengen von Fettsäure und Desoxycholsäure durch einfache Kristallisation des Gemisches der Komponenten beweisen. Durch diese synthetische Methode ließen sich Choleinsäuren mit Palmitin-, Stearin- und Oleinsäure herstellen. Diese Choleinsäuren mit verschiedenen Fettsäurekomponenten bilden Mischkristalle miteinander, so daß die Möglichkeit besteht, daß eine natürlich vorkommende Choleinsäure verschiedene Fettsäuren enthält. Die Fettsäure $C_{17}H_{34}O_2$ ist ein Gemisch von Palmitin- und Stearinsäure.

Diese Kombination von Fettsäure und Desoxycholsäure zu einer Anlagerungsverbindung erkannten Wieland und Sorge als ein allgemeineres Aufbauprinzip. Sie konnten zeigen, daß sich die Reaktion auf die ganze Klasse der Fettsäuren und auch auf sehr viele andere organische Verbindungen übertragen läßt. So bildet die Desoxycholsäure

mit Xylol und mit Naphtalin je eine Verbindung im Verhältnis 2 : 1. Weiter wurden Choleinsäuren mit Benzoesäure, Benzaldehyd, Kampher, Phenol, Carvon, Salol, Cholesterin und anderen Stoffen erhalten.

Durch die Arbeiten von Wieland und von Rheinboldt[34]), der die Zustandsdiagramme zwischen Desoxycholsäure und den verschiedensten Fettsäuren untersuchte, erhält man folgendes Bild vom Aufbau der Choleinsäuren bei Variation der Fettsäurekomponente: Die Ameisensäure bildet keine Anlagerungsverbindung, Essigsäure liefert eine Verbindung 1 : 1. Propionsäure addiert sich im Verhältnis 1 : 3 Desoxycholsäure. Bei den Fettsäuren mit 4—8 C-Atomen (Buttersäure bis Caprylsäure) ist das Verhältnis 1 : 4, bei den Säuren mit 9 bis 14 C-Atomen (Pelargon- bis Myristylsäure) ist es 1 : 6. Bei den höheren Fettsäuren, untersucht bis zur Montansäure $C_{29}H_{58}O_2$ liegt das Verhältnis 1 : 8 vor. Die ungesättigten Fettsäuren reihen sich nach der Zahl ihrer Kohlenstoffatome in diese Gesetzmäßigkeit ein. Auch verzweigte Fettsäuren zeigen das gleiche Bild[35]).

Das Aufbauprinzip der Choleinsäuren entspricht dem der aus der anorganischen Chemie bekannten Koordinationsverbindungen. An die Stelle des Zentral*atoms* tritt hier eine organische Zentral*molekel*, die als Koordinationszentrum wirkt. Die Koordinationszahl ist in diesem Falle von der Kettenlänge der als Koordinationszentrum wirkenden Fettsäure abhängig. Interessant ist es, daß in diesen Verbindungen ebenso wie bei den anorganischen Typen die Koordinationszahlen 4, 6 und 8 bevorzugt sind.

Außer den Änderungen durch die Fettsäurekomponente hat man auch den Einfluß der Substitution der Gallensäure untersucht. Hierbei zeigte sich, daß von allen anderen bekannten Gallensäuren nur die Apocholsäure[36]), die 3,12-Dioxycholensäure, die gleiche Fähigkeit zur Bildung von Choleinsäuren hat. Cholsäure, Lithocholsäure usw. vermögen keine Verbindungen dieses Typs zu bilden.

Die Bindung innerhalb des Komplexes ist so stark, daß die Choleinsäuren wohl definierte Salze zu bilden vermögen. So bildet die Choleinsäure aus Galle ein einheitliches Bariumsalz, in das der ganze Komplex unverändert eingeht. Die Alkalisalze der Choleinsäure sind nicht in kristallisierter Form erhalten worden, doch spricht für ihre Existenz der Befund, daß alkalische Lösungen der Desoxycholsäure in der Lage sind, die in Wasser schwerlöslichen Natronseifen leicht aufzulösen. Über-

[34]) A. 451, 256 (1926); 473, 249 (1929).
[35]) Chargaff und Abel, Biochem. J. 28, 1901 (1934).
[36]) Bödecker, B. 53, 1852 (1920). Rheinboldt, H. 180, 180 (1929).

raschend ist es, daß in dieser alkalischen Lösung der Desoxycholsäure ihre Bindungsfähigkeit für Fettsäuren stark gestiegen ist. So vermag sie nicht nur, wie nach der Zusammensetzung der zugehörigen Choleinsäure zu erwarten wäre, ein Achtel Äquivalent Natrium-palmitat zu lösen, sondern die Lösefähigkeit ist um das Vierfache gestiegen. Ein Molekül Natronseife wird von zwei Molekülen Natriumdesoxycholat gelöst. Als Salz zeigt die Desoxycholsäure also ein weit größeres Bindungsvermögen als die freie Säure und ebenso hat die Cholsäure, die als freie Säure überhaupt keine Choleinsäure zu bilden vermag, als Salz auch eine Lösefähigkeit für die Natronseife und andere Stoffe.

Bei einer Choleinsäure, deren eine Komponente ein neutraler, in Wasser unlöslicher Stoff ist, treten in alkalischer Lösung Gleichgewichte zwischen choleinsaurem Salz und den Komponenten auf. So scheidet sich aus einer ammoniakalischen Lösung der Naphtalin-Choleinsäure ein Teil des Naphtalins aus, geht aber auf Zusatz von Natriumdesoxycholat in Lösung. Damit ergibt sich die allgemeine Möglichkeit, in Wasser unlösliche Stoffe, etwa Cholesterin, Strychnin, Kampher, Azobenzol und andere mit Hilfe einer Lösung von Natriumdesoxycholat oder Natriumcholat in eine wasserlösliche Form zu bringen.

Aus diesen Untersuchungen über die Löslichkeitsveränderungen organischer Stoffe bei Anwesenheit von gallensauren Salzen hat Wieland[37]) wichtige Schlüsse über die Funktion der Gallensäuren im Organismus gezogen. Voraussetzung für eine Übertragung der in vitro gefundenen Verhältnisse auf den Organismus ist jedoch, daß die gepaarten Gallensäuren, die in der Galle vorhanden sind, sich ebenso wie die freien Säuren und ihre Salze verhalten. Aus der Galle sind von Wahlgren[38]) und von Gulbring[39]) gepaarte Choleinsäuren, die Glykocholeinsäure und die Taurocholeinsäure isoliert worden, so daß also das Aufbauprinzip der Choleinsäuren auch für die gepaarten Gallensäuren gilt. Tatsächlich lassen sich mit Gallenflüssigkeit die gleichen Erfahrungen hervorrufen, die oben bei den Salzen der freien Gallensäuren beschrieben wurden.

Damit ergibt sich eine einfache Erklärung dafür, daß auch die Nahrungsstoffe, die nicht bei der Verdauung durch hydrolysierende Fermente abgebaut werden, so leicht resorbiert werden. Sie werden durch die in den Magen und Darm sezernierte Gallenflüssigkeit in eine wasserlös-

[37]) Wieland und Sorge, H. 97, 10 (1916).
[38]) H. 36, 566 (1902).
[39]) H. 45, 456 (1906).

liche Form gebracht. Auf diese Weise können ungespaltene Fette resorbiert werden und auch die Tatsache, daß Alkaloide, die in vitro durch den alkalischen Darmsaft ausgeschieden werden, im Organismus so leicht resorbiert werden, ist damit auf einen einleuchtenden Grund zurückgeführt. Von dieser Erhöhung der Resorptionsfähigkeit durch Gallensäuren hat man auch praktischen Gebrauch gemacht: in dem Präparat „Cadechol" liegt eine Verbindung von Kampher mit Desoxycholsäure vor[40]). Auf den Einfluß der Gallensäuren auf die Cholesterin-Resorption und -Ausscheidung war oben schon hingewiesen worden. v. Euler[41]) konnte den Nachweis führen, daß Carotin durch Zusatz von Natriumsalzen der Gallensäuren in Wasser in eine echte Lösung zu bringen ist. In dieser Form ist das Carotin resorbierbar; die Gallensäuren spielen also hier eine sehr wesentliche Rolle für den Transport des zur Vitamin-A-Bildung notwendigen Carotins. Auch die Aktivierung der Lipasen durch gallensaure Salze[42]) dürfte mit der Erhöhung der Löslichkeit der Fette zusammenhängen. Der „Aktivator" beeinflußt also hier nicht das Enzym selbst, sondern verändert nur das Reaktionsmedium.

Von den sonstigen physiologischen Eigenschaften der Gallensäuren sei noch die hämolytische Wirkung erwähnt[43]). Interessant ist es auch, daß das Methyl-cholanthren (s. S. 66), das Umwandlungsprodukt der 12-Ketocholansäure, eine außerordentlich starke krebserregende Wirkung hat, welche die der aus dem Teer isolierten Kohlenwasserstoffe (Benzpyrene) noch übertrifft[44]).

Eine große Zahl von Arbeiten japanischer Forscher[45]) beschäftigen sich mit dem Einfluß der Gallensäuren auf den Kohlenhydratstoffwechsel. Es konnte eine Förderung der Glykogenbildung, eine Erhöhung des Glykogengehalts in Leber und Muskeln festgestellt werden. Über den Einfluß auf den Calciumstoffwechsel s. [46]). Die von Ziegler[47]) angegebene spezifische Wirkung von Gallensäuren auf Pneumokokken konnte nicht bestätigt werden[48]).

[40]) Rheinboldt, H. 184, 219 (1929).
[41]) v. Euler und Klussmann, H. 219, 216 (1933).
[42]) Hamsik, H. 65, 232 (1910). Shoda, C. 1928 II, 1350. Nedwedski, H. 236, 69 (1935).
[43]) Patzschke und Jaudas, Z. f. Immunitätsf. 28, I 368 (1919).
[44]) Cook c. s., Soc. 1934, 431.
[45]) 31. Mitt. C. 1934 II, 3400, d. frühere. 26. und 27. Mitt. Bio. Z. 265, 76, 80 (1933).
[46]) 7. Mitt. C. 1933 II, 3006.
[47]) C. 1933 II, 2389.
[48]) Domagk, Vortrag, Königsberg 1935. S. Z. f. ang. Ch. 48, 480 (1935).

AVc. Die biologische Bildung der Gallensäuren

Die nahe Verwandtschaft im Aufbau der Gallensäuren und des Cholesterins legt die Vermutung nahe, daß das Cholesterin ihre Muttersubstanz ist. Bilanzversuche[49]) ergaben jedoch, daß nach Zufuhr von Cholesterin oder -estern, per os oder durch intravenöse Injektion, keine Mehrausscheidung von Gallensäuren zu erzielen war. Auch die Zufuhr von Scymnol (s. u.) oder Squalen hatte keine Steigerung zur Folge[50]). Bei Verwendung von Koprosterin, das ja schon das den Gallensäuren entsprechende cis-Dekalinderivat darstellt, oder von Allo-cholesterin, das sich in vitro in dieses umwandeln läßt, konnte ein Ansteigen der ausgeschiedenen Gallensäuremengen festgestellt werden[51]). Doch sind die Mengen nicht äquivalent; bei Zufuhr von 1,5 g Allocholesterin stieg die Gallensäureausscheidung um 4,5 g über die Norm, so daß dieser Effekt auch möglicherweise auf eine anregende Wirkung dieser Stoffe zurückzuführen ist. Enderlen, Thannhauser und Jenke kommen aus ihren Versuchen zu dem Ergebnis, daß zwar eine Bildung von Gallensäuren aus dem Cholesterin nicht ausgeschlossen ist, aber nicht zwangsläufig notwendig ist. Ein Hund mit Gallenfistel, der exogen 7,67 g Sterin erhielt, schied im Laufe von 59 Tagen 71,97 g Cholsäure aus. Der berechnete Vorrat an endogenem Cholesterin könnte auch diese Menge nicht decken. Die gleichzeitig im Kot ausgeschiedene Menge an Sterinen war größer als die exogene Zufuhr. Es scheint daher wahrscheinlich, daß die Gallensäuren neben dem Cholesterin in der Leber aus einer gemeinsamen Quelle (Fette und Kohlenhydrate) synthetisiert werden.

Möglicherweise sind die oben erwähnten Ketosäuren, die man aus Rinder- und Schweinegalle isoliert hat, als Zwischenstufen einer Synthese anzusehen. Untersuchungen japanischer Forscher[52]) unterrichten über das Schicksal von Keto-cholansäuren im Krötenorganismus. Dehydro-cholsäure und Dehydro-desoxy-cholsäure, die als Natriumsalze subkutan verabreicht wurden, konnten aus dem Harn und aus den Gallen als Oxy-keto-cholansäuren wiedergewonnen werden. Die Reduktion hat sehr wahrscheinlich in beiden Fällen am C-Atom 3 angesetzt, doch entstanden augenscheinlich die zu den natürlichen Gallensäuren epimeren Formen. Die aus Dehydro-cholsäure entstandene 3-Oxy-7,12-diketo-

[49]) Thannhauser, D. Arch. klin. Med. 141, 290 (1923). Enderlen, Thannhauser und Jenke, Klin. Ws. 5, 2340 (1926). Arch. exp. Path. Pharm. 130, 292 (1928).

[50]) Jenke, Arch. exp. Path. Pharm. 163, 175 (1931).

[51]) Enderlen, Arch. exp. Path. Pharm. 130, 308 (1928).

[52]) Yamasaki und Kyogoku, H. 233, 29 (1935), 235, 43 (1935).

cholansäure ist verschieden von Redukto-dehydro-cholsäure, die die gleiche Strukturformel hat. Durch Wolf-Kishnerreduktion ihres Disemicarbazons ließ sie sich in eine 3-Oxy-cholansäure[53]) verwandeln, die von der Lithocholsäure verschieden ist, sich aber durch Oxydation in Dehydro-lithocholsäure verwandeln ließ.

Die große Mannigfaltigkeit der verschiedenen Gallensäuren, die man bei den einzelnen Tieren findet, der nur ein einziges Sterin, das Cholesterin (mit seinen Hydrierungsprodukten) gegenübersteht, läßt vermuten, daß ein Übergang Cholesterin-Gallensäuren, wenn er überhaupt stattfindet, sicher nicht nach einem einzigen, einheitlichen Schema verläuft.

A VI. Substanzen, die nach ihrer Konstitution zwischen Sterine und Gallensäuren einzureihen sind

Ein besonderes Interesse beanspruchen daher die Substanzen, die eine Zwischenstellung zwischen Sterinen und Gallensäuren einnehmen. Ihre Untersuchung kann vielleicht einen Anhaltspunkt liefern, auf welchem Weg der Organismus eine solche Umwandlung durchführen mag. Zu diesen Stoffen gehört das Scymnol aus der Haifischgalle, verschiedene Stoffe aus der Krötengalle und die Sterocholsäure, die aus der Rindergalle isoliert wurde.

Das Scymnol. Scymnol wurde zuerst von Hammarsten[54]) aus der Galle des Haifischs isoliert. Es ist ein neutraler Stoff von der Zusammensetzung $C_{27}H_{46}O_5$. In der Gallenflüssigkeit ist das Natriumsalz des sauren Schwefelsäureesters des Scymnols vorhanden. In dieser Form hat die Substanz wohl die gleichen Funktionen zu erfüllen wie die gepaarten Gallensäuren der höheren Wirbeltiere, also in Wasser unlösliche Stoffe zu emulgieren. Interessant ist es, daß sich im Haifischorganismus das gleiche Bauprinzip des Emulgierungsmittels findet, das man heute bei modernen Waschmitteln, z. B. im Natriumsalz der Dodecylschwefelsäure benutzt.

Zur Darstellung der Scymnol-Schwefelsäure löst man die mit Alkohol schleimfrei gemachte Haifischgalle in Wasser und fällt die Säuren mit Blei-

[53]) Diese Säure ist identisch mit der von Fernholz*) durch Oxydation des Koprosterylacetats und von Reindel**) durch katalytische Hydrierung der Dehydro-lithocholsäure in saurem Medium dargestellten β-3-Oxy-cholansäure. Schmp. 177/78°. $[\alpha]_D = +25{,}8°$ (Alkohol). Methylester: Schmp. 115/16°.

*) H. 232, 97 (1935). Chakrabarty, Diss. Göttingen 1935.

**) B. 68, 1243 (1935).

essig und Ammoniak aus. Aus dem Bleisalz-Niederschlag stellt man durch Umsetzung mit Sodalösung die Natriumsalze dar. Aus der 3- bis 5prozentigen wäßrigen Lösung der Natriumsalze scheidet sich nach Zusatz von 40proz. Kalilauge das Kaliumsalz der Scymnol-Schwefelsäure in weißen, mikroskopisch kleinen Nadeln ab, die durch Lösen in Wasser und erneute Ausfällung mit Kalilauge gereinigt werden können. In den Mutterlaugen befindet sich noch ein leichter lösliches Produkt, das von Hammarsten zur Unterscheidung als β-Scymnol-Schwefelsäure bezeichnet wird, doch ist noch nicht sicher entschieden, ob hier tatsächlich ein chemisches Individuum oder nur eine verunreinigte Scymnolschwefelsäure (die erst erwähnte wird α-Säure genannt) vorliegt.

Zur Gewinnung des freien Scymnols kann man entweder das scymnol-schwefelsaure Kalium verseifen oder die durch Umlösen aus Alkohol schleimfrei gemachte rohe Haifischgalle mit 10prozentiger Kalilauge verseifen[55]). Aus der Reaktionslösung scheidet sich das Scymnol als dickes Öl ab. Es wird in wäßrigem Methylalkohol gelöst. Aus dieser Lösung scheidet es sich kristallin in kleinen verfilzten Nadeln, die unscharf bei 99/101° schmelzen, aus. Durch wiederholtes Umkristallisieren aus wäßrigem Aceton läßt sich der Schmelzpunkt auf 115° steigern. Das auf diese Weise gewonnene Scymnol ist kristallwasserhaltig. Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Essigester erscheint es in wasserfreier Form, kleinen Blöcken vom Schmp. 187°.

Das Scymnol gibt die Pettenkofersche Reaktion, die Schiffsche Cholesterinreaktion und eine dem Cholesterin ähnliche Liebermann-Burchardsche Reaktion. Reines Scymnol zeigt nicht, wie von Hammarsten angegeben, mit 25prozentiger Salzsäure eine Blaufärbung. Diese rührt augenscheinlich von einer anhaftenden Verunreinigung her.

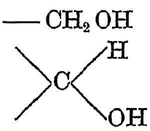
Scymnol ist ein Tetra-oxy-oxyd[55]). Das Scymnol ist ein gesättigter Stoff: es wird von katalytisch erregtem Wasserstoff nicht hydriert, Brom, Permanganat und Benzopersäure greifen es in der Kälte nicht an. Durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin gelingt es das Scymnol in ein Tetracetylderivat zu verwandeln. Es enthält also vier veresterbare Hydroxyle. Das Tetracetylderivat reagiert nicht mehr unter Methanentwicklung mit Methylmagnesiumjodid, es enthält also keine freie Hydroxylgruppe mehr. Scymnol tritt nicht mit Keton-Reagentien in Reaktion und wird auch durch Reduktion mit Natrium und Alkohol nicht verändert. Es liegt die Vermutung nahe, daß das fünfte

[54]) Hammarsten, H. 24, 323 (1898). Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. (Abderhalden) I, 6, 225.

[55]) Windaus, Bergmann und König, H. 189, 148 (1930).

Sauerstoffatom, das sich bei diesen Umsetzungen passiv verhält, oxydartig gebunden ist. Hierauf läßt sich wohl auch die Fähigkeit des Scymnols zurückführen, mit Chlorwasserstoff ein schön kristallisiertes Hydrochlorid zu bilden, das mit Alkalien das Ausgangsmaterial zurückliefert.

Die Art der Bindungen der Hydroxylgruppen ergibt sich aus dem Verhalten des Scymnols bei der Chromsäureoxydation. Es geht hierbei in eine Oxydo-triketo-monocarbonsäure $C_{27}H_{38}O_6$ über; bei der Oxydation sind demnach drei sekundäre Hydroxyle in Ketogruppen und eine primäre in die Carboxylgruppe verwandelt worden. Der Oxyd-Sauerstoff ist unverändert geblieben. Die Formel des Scymnols läßt sich damit zunächst folgendermaßen auflösen:

$C_{27}H_{46}O_5 = C_{23}H_{37}$ 

Ersetzen wir in der Formel $C_{27}H_{46}O_5$ des Scymnols die Sauerstoffatome ihrer Funktion entsprechend durch Wasserstoff, so kommen wir zu dem Grundkohlenwasserstoff des Scymnols von der Zusammensetzung $C_{27}H_{48}$, d. h. dieses Produkt müßte isomer mit dem Cholestan sein, also ebenfalls ein Vierringskelett enthalten. Es gelang T s c h e s c h e[56]), den Nachweis zu führen, daß dieses Grundskelett mit dem der Sterine und Gallensäuren identisch ist.

Tetracetyl-scymnol $C_{35}H_{54}O_9$. Aus Methanol umkristallisiert. Große Tafeln vom Schmp. 148°.

Scymnol-hydrochlorid $C_{27}H_{47}O_5Cl$. Aus Methanol kleine Nadeln vom Schmp. 196°. Aus wasserhaltigen Lösungsmitteln entsteht mit Chlorwasserstoff ein isomeres Hydrochlorid vom Schmp. 126°.

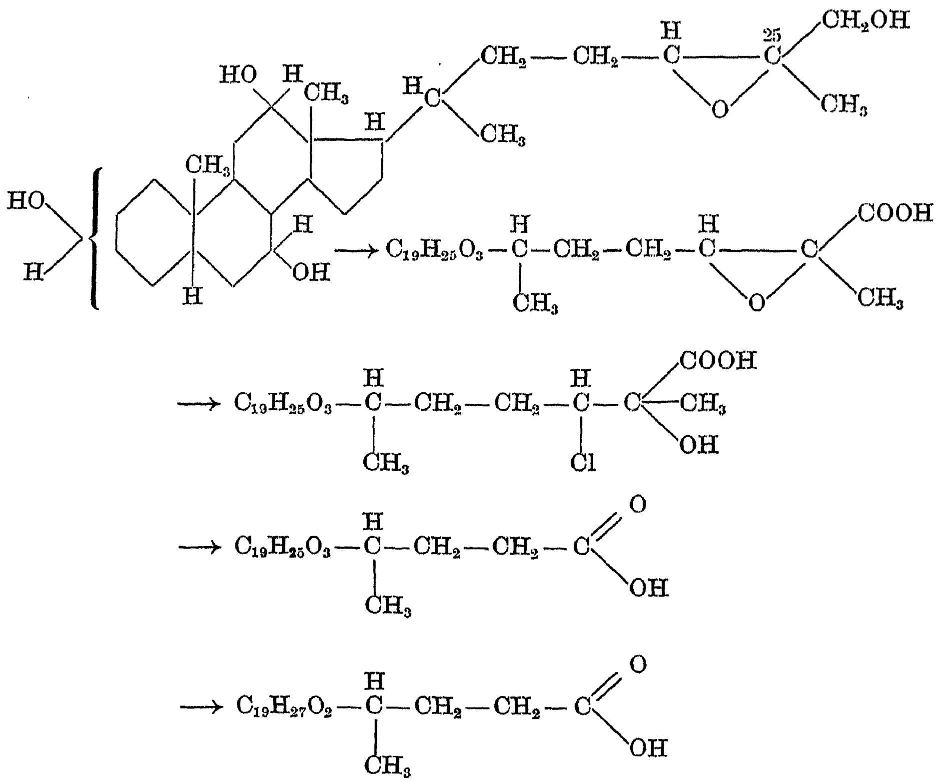
Oxydo-triketo-carbonsäure $C_{27}H_{38}O_6$. Aus Chloroform-Petroläther umkristallisiert. Nadelbüschel vom Schmp. 236°. Trioxim kleine Nadeln, die sich zwischen 240 und 250° zersetzen.

D i e K o n s t i t u t i o n d e s S c y m n o l s. Die Oxydo-triketo-carbonsäure bildet ebenso wie das Scymnol ein Hydrochlorid. Oxydiert man dieses mit Chromsäure, so entsteht eine halogenfreie Triketo-carbonsäure $C_{24}H_{34}O_5$. Bei der Oxydation sind also drei Kohlenstoffatome aus dem Ausgangsmaterial abgespalten worden, und man ist so zu einem Produkt gekommen, das die gleiche Zusammensetzung wie die Dehydrocholsäure hat. In den Konstanten und denen ihrer Derivate sind aber

[56]) H. 203, 263 (1931).

Unterschiede vorhanden. Durch Clemmensenreduktion läßt sich eine Ketogruppe reduzieren und dieses Umwandlungsprodukt, eine Diketocarbonsäure, ist mit einem schon bekannten Gallensäurederivat, der 7,12-Diketo-cholansäure, identisch. Damit ist der Nachweis erbracht, daß dem Scymnol das gleiche Kohlenstoffskelett wie den anderen Gallensäuren zugrunde liegt.

Zugleich sind damit die Stellungen von zwei Hydroxylen des Scymnols festgelegt, und wir können die durchgeführten Experimente in folgenden Formelbildern darstellen:



= 7, 12-Diketocholansäure

Die primäre Hydroxylgruppe steht an einem C-Atom der Isopropylgruppe der Seitenkette und drei sekundäre Hydroxyle befinden sich im Kohlenstoffskelett. Der Oxydring ist ein Aethylen-oxyd-Ring und geht von dem C-Atom 25 aus, entweder nach C-26 oder nach C-24. Die letzte Annahme scheint durch die leichte Abspaltbarkeit der Isopropylgruppe bei der Oxydation des Hydrochlorids wahrscheinlicher. Die Stellung der dritten sekundären Hydroxylgruppe ist nicht gesichert. Die Stellung an

C-Atom 3 scheidet vielleicht aus, da die neue Triketocarbonsäure nicht mit der Dehydro-cholsäure identisch zu sein scheint, doch bedarf diese Frage noch einer erneuten Untersuchung.

Die Frage, ob der im Scymnol vorhandene Oxydring schon in der natürlichen Scymnolschwefelsäure vorliegt oder erst bei der Verseifung künstlich entstanden ist, ist nicht entschieden.

Säure $C_{24}H_{34}O_5$. Die Oxydo-triketosäure $C_{27}H_{38}O_6$ wird in Eisessig gelöst und mit dem gleichen Volumen konz. Salzsäure versetzt. Die Oxy-chlor-triketo-carbonsäure wird mit Wasser ausgefällt und mit Chromsäure in Eisessig bei 80—90° oxydiert. Das Reaktionsprodukt wird in Äther aufgenommen, mit Alkali ausgeschüttelt und mit Salzsäure ausgefällt. Aus Eisessig-Äther oder Aceton-Petroläther Nadeln vom Schmp. 218—220°. Methylester Nadeln vom Schmp. 232/33°. Trioxim des Methylesters: Aus Alkohol Blättchen, die sich bei 234° zersetzen. Durch Clemmensenreduktion entstand aus der Triketosäure die 7,12-Diketocholansäure, die als Methylester, Methylester-trioxim und in freier Form verglichen wurden.

Wieland und Kishi[57]) isolierten aus Rindergalle die sog. Sterocholsäure, die durch ihre Eigenschaft außerordentlich schwerlösliche Alkalisalze zu bilden, aufgefunden werden konnte. Die Säure hat wahrscheinlich die Zusammensetzung $C_{28}H_{46}O_4$, doch hält Wieland eine Formel mit 27 oder 29 C-Atomen nicht für ausgeschlossen. Die bis jetzt aus Materialmangel nur wenigen durchgeführten Experimente ergaben, daß vermutlich eine Monocarbonsäure mit zwei dehydrierbaren Hydroxylen vorliegt. Wieland weist auf den möglichen biologischen Zusammenhang dieser Säure zu den Sterinen hin, den er auch in dem von ihm gewählten Namen der Säure zum Ausdruck bringt.

Sterocholsäure: Aus Eisessig oder Alkohol Nadeln vom Schmp. 256°. Methylester Schmp. 210°.

Stoffe aus der Krötengalle. Neben der schon oben erwähnten Bufodesoxycholsäure $C_{24}H_{40}O_4$ aus der Wintergalle von Bufo vulgaris japonica sind aus dem gleichen Material noch zwei Substanzen isoliert worden. Makino[58]) isolierte einen vierwertigen Alkohol $C_{27}H_{48}O_4$, Shimizu und Osa[59]) fanden eine Säure $C_{28}H_{46}O_5$, eine Trioxymonocarbonsäure, die sie Tri-oxy-bufo-sterocholensäure nennen.

Tetra-oxy-bufostan enthält vier veresterbare Hydroxyle und liefert bei der Chromsäureoxydation eine Tri-ketocarbonsäure $C_{27}H_{40}O_5$. Es enthält also eine primäre und drei sekundäre Hydroxylgruppen

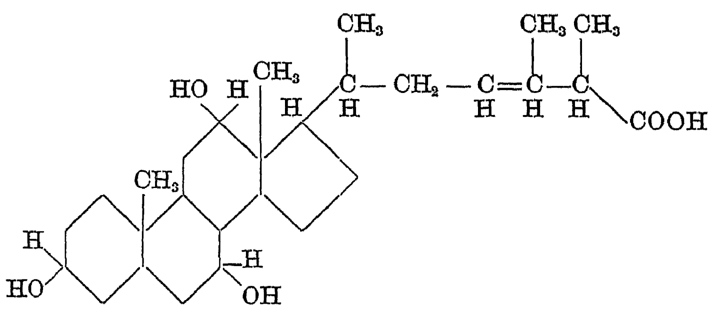
[57]) H. 214, 47 (1933).
[58]) H. 220, 49 (1933).
[59]) H. 227, 74 (1934).

und nach der Zusammensetzung des entsprechenden Kohlenwasserstoffs $C_{27}H_{48}$ vier hydrierte Ringe. Dieser Stoff könnte also ein Zwischenprodukt zwischen dem (in der Krötengalle vorhandenen) Cholesterin und der Bufodesoxycholsäure darstellen. Man kann vielleicht die primäre Hydroxylgruppe ebenso wie im Scymnol an die Isopropylgruppe der Seitenkette verlegen.

Tetraoxybufostan: Aus abs. Alkohol dicke Prismen vom Schmp. 230°. Gibt Hammarsten'sche und Pettenkofer'sche Reaktion, aber keine Farbreaktion nach Liebermann-Burchard. $[\alpha]_D = +37{,}5°$ (in Alkohol).

Triketo-monocarbonsäure: Nadeln aus verd. Alkohol vom Schmp. 221 bis 222°. Aethylester-trioxim: Prismen vom Schmp. 218°.

Die Trioxy-bufo-sterocholensäure ist eine ungesättigte Trioxy-monocarbonsäure. Sie kommt ungepaart in der Krötengalle vor und wird aus dieser als Methylester v. Schmp. 171/172° isoliert. Durch Oxydation mit Chromsäure entsteht eine Triketo-bufosterocholensäure, die durch Clemmensenreduktion in Bufostero-cholensäure und schließlich durch katalytische Hydrierung in die gesättigte Bufosterocholansäure übergeht. Nach der analytischen Zusammensetzung enthält die Trioxy-bufosterocholensäure vier Ringe. Die Doppelbindung wird in α,β-Stellung zum Carboxyl angenommen, da bei der Behandlung mit Brom ein Bromlacton entsteht. Die Forscher geben der Substanz, die nach ihrer Zusammensetzung Beziehungen zum Ergosterin und zu der oben erwähnten Sterocholsäure zeigt, folgendes Formelbild. Eine Entscheidung könnte die Ozonspaltung der Bufosterocholensäure liefern, da man so möglicherweise zur Nor-cholansäure oder Nor-allo-cholansäure kommen könnte.



Trioxy-bufosterocholensäure: Nadeln vom Schmp. 160°.

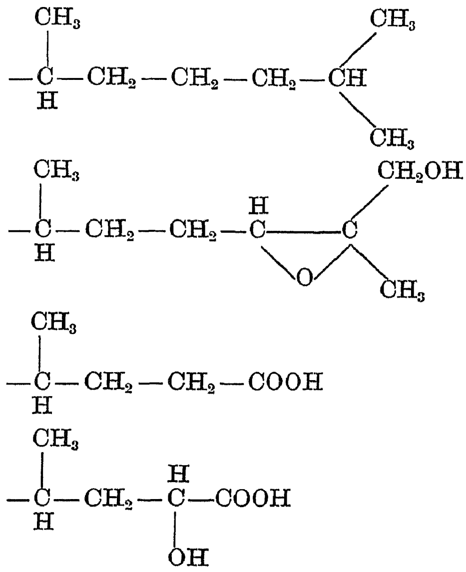
Pettenkofer'sche und Hammarsten-Reaktion positiv.

Triketo-bufosterocholensäure: Schmp. 68/69°. Aethylester-trioxim Nadeln vom Schmp. 238° u. Z.

Bufo-sterocholensäure: Aus Eisessig Blättchen vom Schmp. 142/44°.

Bufostero-cholansäure: Nadeln vom Schmp. 161/62°.

Die Seitenketten des Cholesterins, des Scymnols, der Gallensäuren der höheren Wirbeltiere und der β-Phocaecholsäure seien hier einander noch einmal gegenübergestellt:



Man erkennt, wie die Seitenketten der Gallenbestandteile sich leicht aus der des Cholesterins ableiten lassen. Das Scymnol nimmt eine Zwischenstellung zwischen Cholesterin und Gallensäuren ein, da die Oxydation noch nicht zu einem Verlust von C-Atomen geführt hat. In der β-Phocaecholsäure hat die Oxydation schon ein weiteres C-Atom erfaßt. Sie bildet also das Schlußglied der Reihe Cholesterin—Scymnol—Gallensäuren—β-Phocaecholsäure.

B. Die neutralen Saponine

B I. Einleitung

In neuerer Zeit ist noch für eine andere Gruppe von Naturstoffen, für die neutralen Saponine, nachgewiesen worden, daß sie das gleiche charakteristische Cyclo-pentano-perhydro-phenanthren-Skelett enthalten wie die Sterine und Gallensäuren.

Die neutralen Saponine sind Glycoside wie die Herzgifte und kommen im Pflanzenreich, meistens mit Herzgiften vergesellschaftet, weit verbreitet vor. Sie haben ihren Namen daher, daß ihre wäßrigen Lösungen ähnliche physikalische Eigenschaften besitzen wie Seifenlösungen: In wäßriger Lösung liefern sie beim Schütteln einen haltbaren Schaum, sie wirken auf Öle emulgierend und erschweren das Absetzen feiner Teilchen; technisch werden die Saponine daher als Waschmittel verwendet. Sie sind in Wasser gut löslich, in Äther und Chloroform dagegen unlöslich.

Neben der Gruppe der neutralen Saponine finden wir noch die sog. sauren Saponine. Über die Konstitution der sauren Saponine bzw. ihrer Genine ist man noch nicht sicher unterrichtet. Es scheint festzustehen, daß ihr Kohlenstoffskelett komplizierter aufgebaut ist als das der Sterine und Gallensäuren; sie besitzen wahrscheinlich ein Gerüst von 5 Ringen und sind in die Gruppe der Polyterpene oder Polyterpenoide einzureihen.

Die Saponine besitzen mannigfache physiologische Eigenschaften. Die bemerkenswerteste ist die, daß sie rote Blutkörperchen aufzulösen vermögen; weiterhin üben sie eine Giftwirkung auf Fische und niedere Tiere aus, entfalten eine Reizwirkung auf das Auge und die Geschmacksorgane.

Die Saponine sind, wie schon erwähnt, sämtlich Glycoside und enthalten Hexosen, Pentosen, Methylpentosen und auch Glucuronsäure gepaart mit einem Genin. Die Hydrolyse läßt sich bisweilen, wie bei den Herzgiften, stufenweise durchführen; die noch zuckerhaltigen Spaltstücke nennt man Prosapogenine, die zuckerfreien heißen Endsapogenine. Außer den glycosidisch gebundenen Zuckern sollen gelegentlich auch Fettsäuren esterartig an das Genin gebunden sein.

Die gut untersuchten Vertreter der neutralen Saponine und die aus ihnen durch Abspaltung der Zuckerreste gewonnenen Genine sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Digitonin aus Digitalis purpurea,	Digitogenin[1])	$C_{27}H_{44}O_5$
Gitonin aus Digitalis purpurea,	Gitogenin[2])	$C_{27}H_{44}O_4$
Tigonin aus Digitalis purpurea,	Tigogenin[3])	$C_{27}H_{44}O_3$
Sarsasaponin aus Radix sarsaparillae, (Parillin)	Parigenin[4])	$C_{27}H_{44}O_3$
Saponin aus Chlorogalum pomeridianum,	Chlorogenin[5])	$C_{27}H_{44}O_4$?

Die Konstitution der Sapogenine Digitogenin, Gitogenin, Tigogenin und Paragenin ist neuerdings in den wesentlichen Punkten aufgeklärt worden. Den ersten Hinweis, daß diese neutralen Sapogenine das gleiche charakteristische Vierringsystem besitzen wie die Sterine und Gallensäuren, vermittelten die Ergebnisse der Selendehydrierung. Gitogenin[6]) und Parigenin[6]) lieferten hierbei das bekannte γ-Methyl-cyclopentenophenanthren. Da es Tschesche[7]) vor kurzem gelang, Digitogenin und Tigogenin genetisch mit Gitogenin zu verknüpfen, sind auch diese Genine in die Reihe der Cyclo-pentano-perhydro-phenanthren-Derivate eingereiht worden. Den biologischen Zusammenhang zwischen Sterinen und neutralen Sapogeninen sieht Windaus darin, daß die Saponine Oxydationsprodukte der Sterine darstellen.

Bis vor kurzem hatte man noch diesen Geninen Formeln mit 26 Kohlenstoffatomen zugeschrieben. Es lagen einige Beobachtungen vor, die dafür sprachen, daß die neutralen Sapogenine eine Seitenkette von 8 Kohlenstoffatomen besitzen. Ruzicka und v. Veen[8]) hatten bei

[1]) Kiliani, B. 23, 1555 (1890); B. 43, 3562 (1910); B. 49, 701 (1916); B. 51, 1613 (1918); Kiliani u. Merk, B. 34, 3562 (1901); Windaus u. Willerding, H. 143, 33 (1925); Windaus u. Shah, H. 151, 86 (1926).

[2]) Windaus u. Schneckenburger, B. 46, 2628 (1913); Windaus u. Linsert, H. 147, 275 (1925); s. auch die unter [1]) aufgeführten Arbeiten.

[3]) Windaus, H. 150, 205 (1925); Jacobs u. Fleck, J. biol. Chem. 88, 545 (1930).

[4]) Power u. Salway, J. chem. Soc. 105, 201 (1914); Kaufmann u. Fuchs, B. 56, 2527 (1923); v. d. Haar, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 48, 726 (1929). Jacobs u. Simpson, J. biol. Chem. 105, 501 (1934). Simpson u. Jacobs, J. biol. Chem. 109, 573 (1935).

[5]) Liang u. Noller, Am. Soc. 57, 525 (1935).

[6]) Jacobs u. Simpson, J. biol. Chem. 105, 501 (1934); Jacobs u. Simpson, Am. Soc. 56, 1424 (1934).

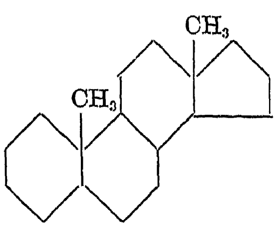
[7]) B. 68, 1090 (1935).

[8]) H. 184, 69 (1929).

der Selendehydrierung des Parigenins Methyl-isohexylketon erhalten und weiterhin hatten Jacobs und Simpson[6]) gefunden, daß sowohl Gitogenin als auch Parigenin beim Kochen mit Eisessig und Salzsäure, also unter wesentlich milderen Bedingungen, ein Keton $C_8H_{14}O_3$ abspalten. So lange man aber den Sapogeninen Formeln mit 26 C-Atomen zugrunde legte, blieben, nach Abzug von 8 Kohlenstoffatomen für die Seitenkette, für das Ringsystem nur noch 18 C-Atome übrig, während das normale Vierringsystem der Sterine und Gallensäuren (mit den beiden quartär gebundenen Methylgruppen) aus 19 Kohlenstoffatomen aufgebaut ist.

Simpson und Jacobs[4]) kamen dann auf Grund zahlreicher Analysen, die sie bei ihren Arbeiten über das Parigenin gesammelt hatten, zu dem Ergebnis, daß dem Parigenin eine Formel mit 27 C-Atomen zukomme und sie äußerten die Vermutung, daß auch für die anderen neutralen Sapogenine Formeln mit 27 C-Atomen wahrscheinlich seien.

Den eindeutigen Beweis für die Richtigkeit dieser Vermutung erbrachten schließlich Tschesche und Hagedorn[9]) dadurch, daß es ihnen gelang, Tigogenin zu einem Gallensäure-Derivat, zu der Aetio-allo-biliansäure, abzubauen (s. S. 169). Hierdurch ist bewiesen, daß Digitogenin, Gitogenin und Tigogenin das Vierringsystem der Sterine und Gallensäuren enthalten:



B II. Die einzelnen neutralen Saponine

B II a. Digitonin und Digitogenin

Das Digitonin[1]) findet sich (s. S. 175) hauptsächlich und in reichlicher Menge in den Samen von Digitalis purpurea. Die Saponinfraktion, die infolge ihrer Unlöslichkeit in Äther und Chloroform leicht von den Herzgiftglycosiden abgetrennt werden kann, ist nicht einheitlich, sondern stellt ein kompliziertes Gemisch dar. Die einzelnen Bestandteile dieses Saponingemisches lassen sich nur mit großer Mühe in reinem Zustande darstellen. So enthält z. B. das Digitonin des Handels wechselnde Mengen Gitonin und andere Saponine in etwa folgendem Verhältnis: 70—80% Digitonin, 10—20% Gitonin und 5—15% Nebensaponine.

Das Digitonin läßt sich trotz seines großen Kristallisationsvermögens nur sehr schwer vollständig von diesen Nebenglycosiden befreien. Schmelzpunkt, Drehung, Analyse und mikroskopische Untersuchung sind zur einwandfreien Feststellung des Reinheitsgrades nicht ausreichend. So ist es zu verstehen, daß man erst viele Jahre nach Auffindung des kristallisierten Digitonins entdeckte, daß das als einheitlich aufgefaßte Material noch etwa 15% Gitonin enthielt. Die bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Arbeiten waren also mit einem Gemisch verschiedener Saponine durchgeführt worden, und die beschriebenen Umwandlungsprodukte leiten sich zum Teil von diesem Nebenglycosid ab. Die Gitogensäure z. B., die durch Oxydation des Gitogenins entsteht und die sich gegenüber Oxydationsmitteln als sehr widerstandsfähig erweist, ist häufig fälschlicherweise als Derivat der Digitogensäure angesprochen worden. Die Aufstellung der Formeln der Saponine wurde weiterhin dadurch sehr erschwert, daß die meisten Vertreter dieser Gruppe Komplexverbindungen mit Wasser und den meisten Alkoholen eingehen. Viele der erhaltenen Abbausäuren kristallisieren mit Kristall-Lösungsmittel und halten dies außerordentlich fest; häufig geben sie es nur unter Zersetzung ab. Für die Ableitung der Formeln sind die Methylester der Abbausäuren besser geeignet, da sie eine viel geringere Neigung zur Bildung von Additionsprodukten besitzen. Außer den Analysen waren für die Aufstellung der Formeln die Molekulargewichts- und Methoxyl-Bestimmungen der Abbau-Ester, sowie die Ermittlung der Zahl der reaktionsfähigen Wasserstoffatome der Sapogenine selbst und ihrer Derivate von Bedeutung.

Die Reindarstellung des Digitonins ist also sehr mühsam und schwierig. Um zu einem ziemlich einheitlichen Präparat zu kommen, kann man das Reinigungsverfahren von Kiliani benutzen: Man fällt das Rohdigitonin mit Amylalkohol als schwer lösliche Additionsverbindung aus und löst das so gewonnene vakuumtrockene Material in der 10fachen Menge 50proz. heißen Alkohols. Man läßt stehen, bis sich das Gitonin in Form strukturloser Körner abgeschieden hat, und filtriert ab, sobald sich dem Niederschlage Kristalle beizumischen beginnen; aus dem Filtrat erhält man das Digitonin in schönen Nadeln. Aber auch nach mehrmaliger Wiederholung dieses Verfahrens und anschließendem Umkristallisieren aus 85proz. Alkohol, erhält man kein absolut reines Digitonin, denn beim oxydativen Abbau stößt man noch immer auf Derivate des Gitonins.

Windaus und Shah reinigten das nach Kilianis Vorschrift gewonnene Digitonin auf folgende Weise noch weiter: Man löst das Material zu 5% in 85° warmem Wasser und versetzt nach dem Erkalten mit überschüssigem Äther. Der nach 30 Minuten abgeschiedene Digitoninniederschlag wird nochmals in gleicher Weise umgefällt. Man erhält so sehr reines Digitonin. Gitonin gibt nach der gleichen Methode erst nach 1½ Stunden eine Fällung. Die Mutterlaugen des Digitonins werden mit Amylalkohol versetzt und die ausfallenden Additionsverbindungen nach Kilianis Angaben auf Gitonin verarbeitet.

Die Löslichkeit der beiden Glucoside, Digitonin und Gitonin, wechselt sehr mit dem Wassergehalt. Es lösen je 100 ccm bei 22°:

	Gitonin	Digitonin
abs. Alkohol	0,983 g	1,765 g
95proz. „	0,204	0,447
85proz. „	0,402	0,258
50proz. „	0,778	0,829

Danach eignet sich zur Isolierung des Gitonins 95prozentiger Alkohol, zur Reindarstellung des Digitonins dagegen 85prozentiger Alkohol.

Wenn es darauf ankommt, reines Digitogenin zu erhalten, ist es bequemer, weitgereinigtes Digitonin mit Säuren zu spalten und das erhaltene zuckerfreie Digitogenin über die Acetylverbindung weiter zu reinigen. Es läßt sich ohne weiteres reines Triacetyl-digitogenin darstellen, das sich leicht zu nunmehr ganz reinem Digitogenin verseifen läßt.

Die von Ransom[10]) gemachte Entdeckung, daß die blutkörperchenlösende Wirkung der Saponine durch Zusatz von Cholesterin aufgehoben wird, hat Windaus[11]) zur Auffindung der kristallisierten Additionsverbindungen von Saponinen und Sterinen geführt; die bekannteste ist die von Digitonin und Cholesterin. Physiologische Untersuchungen haben ergeben, daß das Digitonin in der Komplexverbindung tatsächlich entgiftet ist und nicht mehr das hämolytische Vermögen besitzt, das dem freien Digitonin zukommt. Hieraus folgt, daß die Komplexbildung zwischen Digitonin und Cholesterin ausreicht, um die entgiftende Wirkung des Cholesterins auf Digitonin zu erklären. Die Cholesterinester geben keine Fällung mit Digitonin, d. h. sie geben keine Additionsverbindungen und wirken dementsprechend auch nicht entgiftend auf Saponine.

Das Digitonin gibt auch mit zahlreichen anderen Alkoholen Fällungen[12]). Schüttelt man eine 1proz. wäßrige Digitoninlösung mit kleinen Mengen der folgenden flüssigen Stoffe, erhält man eine kristallisierte Fällung: mit den Amylalkoholen, Butylalkoholen, sek. Octylalkohol, Geraniol, Linalool, Phenol, Carvomenthol, d-l-α-Terpineol, sek. Phenyläthylalkohol, ac-Tetrahydro-β-naphthol, Thiophenol, in wäßrig-alkoholischer Lösung mit den festen Substanzen p-Bromphenol, α-Naphthol, β-Naphthol; alles Stoffe, die zur Klasse der Alkohole, Phenole und Thiophenole gehören. Es gelingt auch auf diese Weise, racemische Alkohole in ihre Antipoden zu zerlegen[13]).

[9]) B. 68, 1412 (1935).
[10]) Deutsch. mediz. Wochenschrift, 1901, 194.
[11]) B. 42, 238 (1909).
[12]) Windaus u. Weinhold, H. 126, 299 (1923).
[13]) Windaus, H. 126, 308 (1923).

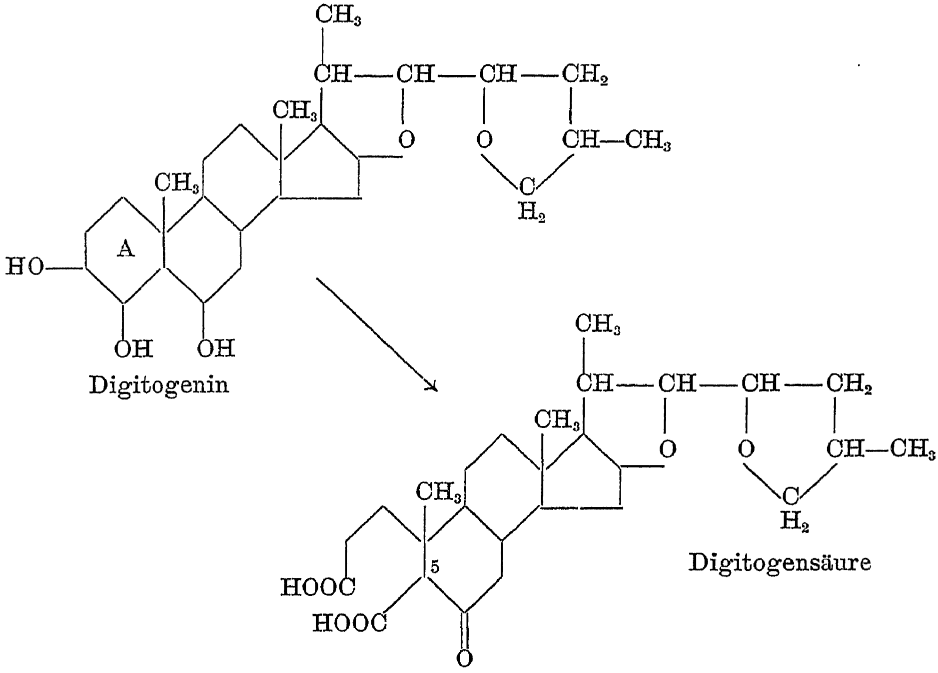
Das Digitonin besitzt die Formel $C_{56}H_{92}O_{29}$[14]) und zerfällt bei der sauren Hydrolyse in Digitogenin $C_{27}H_{44}O_5$, 4 Mol Galactose und 1 Mol Xylose[15]):

$$C_{56}H_{92}O_{29} + 5\,H_2O = C_{27}H_{44}O_5 + 4\,C_6H_{12}O_6 + C_5H_{10}O_5.$$

Das Digitogenin besitzt 3 sekundäre Alkoholgruppen und liefert ein schön kristallisierendes Triacetyl-Derivat. Es reagiert nicht mit Keton- und Aldehyd-Reagenzien, ist neutral und enthält auch keine Lactongruppe. Die beiden restlichen Sauerstoffatome sind wahrscheinlich oxydartig gebunden. Doppelbindungen sind nicht vorhanden. Digitogenin ist also ein gesättigter dreiwertiger Alkohol.

Durch Chromsäure wird Digitogenin schon in der Kälte sehr rasch zur Digitogensäure $C_{27}H_{40}O_7$ oxydiert.

Digitogensäure ist eine Keto-dicarbonsäure und enthält noch 3 hydrierte Ringe, 2 Carboxylgruppen und 1 Ketogruppe; die beiden restlichen Sauerstoffatome sind wiederum nicht nachweisbar und sind sicher oxydisch gebunden wie im Ausgangsmaterial. Die Oxydation des Digitogenins zur Digitogensäure ist folgendermaßen zu formulieren:



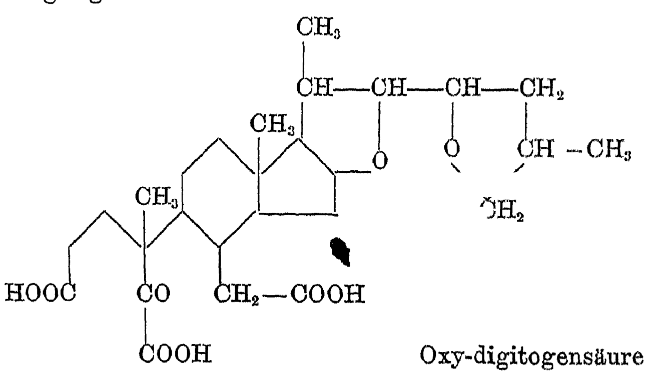
[14]) Die älteren Formeln der Saponine haben naturgemäß den gleichen Zuwachs erfahren wie die Genine, nämlich den einer CH_2-Gruppe.

[15]) Kiliani, B. 59, 2462 (1926).

Die beiden benachbarten, im Ring A befindlichen Hydroxyle gehen unter Aufsprengung des Ringes in zwei Carboxyle über, das 3. sekundäre Hydroxyl wird zur Ketogruppe oxydiert[16]).

Die Digitogensäure ist eine labile Substanz. Durch Erwärmen auf 100° oder durch Kochen mit verd. Laugen geht sie in die isomere Digitosäure über; gleichzeitig entsteht die sog. β-Digitogensäure, die aber nur eine kristallwasserhaltige Form der Digitosäure zu sein scheint. Digitosäure und Digitogensäure sind isomer und unterscheiden sich nur durch die räumliche Lage der Wasserstoffatome am Kohlenstoffatom 5. Digitogensäure-dimethylester lagert sich bei der Destillation im Vakuum in Digitosäure-dimethylester um. Anscheinend stellt der letztere die stabilere stereoisomere Form dar; Digitosäure-dimethylester läßt sich unverändert destillieren.

Bei vorsichtiger Oxydation mit Kaliumpermanganat entsteht aus der Digitogensäure die „Oxy-digitogensäure" $C_{27}H_{40}H_9$. Sie ist eine dreibasische Säure und entsteht in derselben Weise auch aus der Digitosäure und der β-Digitogensäure.



Oxy-digitogensäure

Die Oxy-digitogensäure spaltet beim Erhitzen auf 260° 2 Mol Kohlendioxyd ab; 1 Mol CO_2 wird schon beim Kochen mit Eisessig und etwas Mineralsäure abgespalten. Beim Erhitzen der Säure mit konz. Schwefelsäure und beim trockenen Erhitzen des Trimethylesters auf 275° wird Kohlenoxyd abgespalten, Reaktionen, die für α-Ketosäuren charakteristisch sind[17]).

Die Digitogensäure liefert als Ketosäure ein Semicarbazon. Wenn man dieses Semicarbazon nach der Methode von Wolff-Kishner mit Natriumäthylat erhitzt, gelingt es, eine carbonylfreie Säure zu fassen, die mit der anschließend (S. 164) beschriebenen Gitogensäure

[16]) Windaus u. Weil, H. 121, 62 (1922).
[17]) Windaus und Willerding, H. 143, 33 (1925).

aus Gitogenin identisch ist. Kiliani hatte versucht, diese Reaktion durch Clemmensen-Reduktion mit amalgamiertem Zink und Salzsäure durchzuführen, hatte aber auf diesem Wege keinen Erfolg gehabt.

Digitogenin:[18][19]) 1 Teil Digitonin wird mit 8 Teilen 95proz. Alkohol und 2 Teilen konz. Salzsäure (1,19) 1½ Stunden unter Rückfluß erhitzt. Das beim Erkalten auskristallisierende Digitogenin wird aus Alkohol umkristallisiert. Zur vollständigen Reinigung stellt man durch Erhitzen mit Essigsäureanhydrid das Triacetylderivat dar. Aus Äther, Petroläther oder aus Alkohol Nädelchen. Schmp. 190°. Durch alkalische Verseifung daraus reines Digitogenin, seidenweiche Nadeln aus Alkohol, Schmp. 280—283°.

Digitogensäure:[19]) Je 5 g Digitogenin werden in 50 ccm Eisessig gelöst und unter Kühlung portionsweise mit 40 ccm Kilianischer Chromsäuremischung innerhalb 2—3 Minuten versetzt. Nach längerem Stehen wird die abgeschiedene Säure aus Eisessig umkristallisiert. Digitogensäure besitzt je nach der Art des zum Umkristallisieren verwendeten Lösungsmittels verschiedene Schmelzpunkte, die zwischen 150° und 210° schwanken können; Dimethylester (mit Diazomethan) Schmp. 146°.

Digitosäue:[19]) Aus Digitogensäure durch Behandeln mit alkoholischer Kalilauge; Dimethylester, Nadeln aus Methanol, Schmp. 140°.

Oxy-digitogensäure:[19]) Durch Oxydation von Digitogensäure in alkalischer Lösung mit Kaliumpermanganat; Trimethylester, mit Diazomethan, Kristalle aus verd. Methanol, Schmp. 153°.

Gitogensäure aus Digitogensäure: Das Semicarbazon der Digitogensäure wird im Bombenrohr 8 Stunden mit Natriumäthylat auf 160 bis 170° erhitzt. Das mit Äther isolierte Reaktionsprodukt wird aus Eisessig-Wasser umkristallisiert und liefert die Gitogensäure vom Schmp. 240—242°.

B IIb. Gitonin und Gitogenin

Neben dem Digitonin als Hauptsaponin des Digitalissamens findet sich in viel geringerer Menge das Gitonin[2]). Gitonin ist auch im Digitalinum germanicum vorhanden.

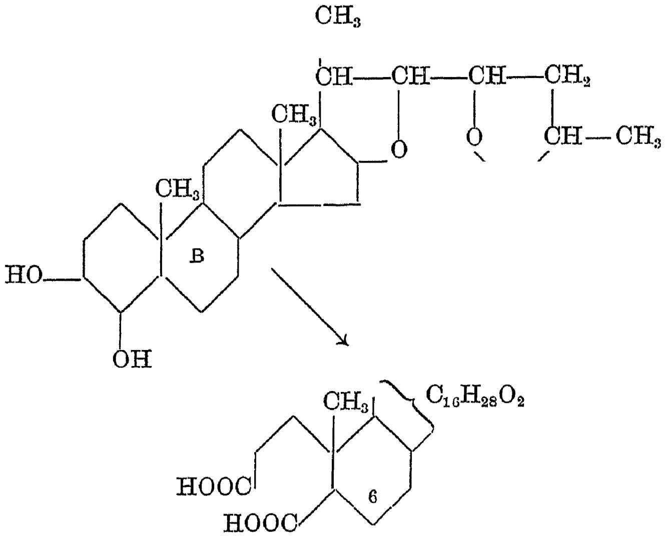
Gitonin besitzt die Formel $C_{50}H_{82}O_{23}$ und zerfällt bei der Spaltung mit Säuren in Gitogenin $C_{27}H_{44}O_4$, 3 Mol Hexose und 1 Mol Pentose:

$$\underset{\text{Gitonin}}{C_{50}H_{82}O_{23}} + 4\,H_2O = \underset{\text{Gitogenin}}{C_{27}H_{44}O_4} + \underset{\text{Hexose}}{3\,C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Pentose}}{C_5H_{10}O_5}$$

Es ist beobachtet worden[20]), daß das Gitogenin in den Digitalisblättern auch in freiem Zustande vorkommen kann; möglicherweise hat in diesen Fällen ein in den Blättern vorhandenes spezifisches Enzym aus dem Gitonin die Zuckerreste abgespalten. Solche Vorgänge sind von der Chemie der Herzgifte bekannt.

[18]) Kiliani u. Merk, B. 34, 3564 (1901).
[19]) Literatur s. Windaus u. Weil, H. 121, 62 (1922).
[20]) Windaus u. Brunken, C. 1925 II, 1049.

Das Gitogenin ist dem Digitogenin sehr ähnlich. Gitogenin $C_{27}H_{44}O_4$ enthält zwei sekundäre Alkoholgruppen, während das Digitogenin $C_{27}H_{44}O_5$ ein dreiwertiger Alkohol ist. Beide Genine enthalten gleicherweise zwei Sauerstoffatome oxydartig gebunden. Gitogenin läßt sich auch leicht mit Chromsäure oxydieren und geht hierbei in eine Dicarbonsäure, die Gitogensäure, über[21]).



Gitogenin

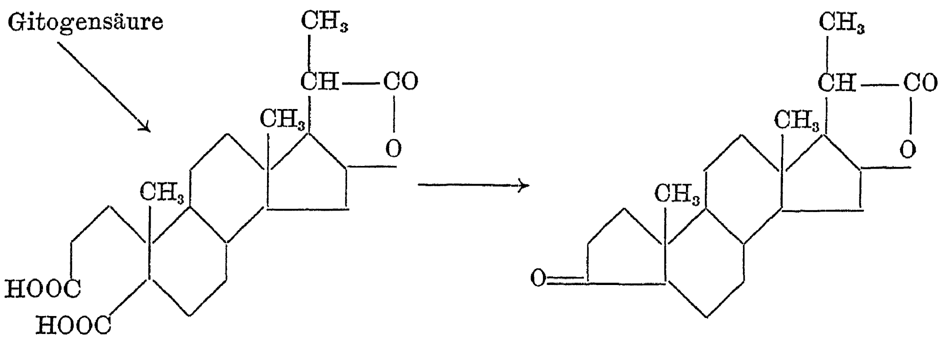
Gitogensäure

Diese Gitogensäure ist, wie schon erwähnt wurde, auch aus Digitogenin erhalten worden, indem die Ketogruppe (an C-6) der Digitogensäure in eine Methylengruppe verwandelt wurde. Digitogenin und Gitogenin enthalten also das gleiche Kohlenstoffgerüst und unterscheiden sich voneinander nur dadurch, daß das erstere in Ring B am C-Atom 6 eine sekundäre Hydroxylgruppe mehr besitzt; Digitogenin kann daher auch als Oxy-gitogenin bezeichnet werden.

Durch Oxydation der Gitogensäure mit heißer konzentrierter Salpetersäure entsteht eine Säure $C_{22}H_{32}O_6$ (I); bei dieser Reaktion sind also 5 Kohlenstoffatome aus dem Molekül der Gitogensäure abgespalten worden. Im Gegensatz zum Ausgangsmaterial enthält die neue Abbausäure nicht mehr die beiden oxydisch gebundenen Sauerstoffatome, sondern neben den ursprünglichen Carboxylen eine neugebildete Lactongruppe. Die aboxydierten 5 Kohlenstoffatome müssen aus der Seitenkette stammen, denn bei der Salpetersäureoxydation ist, wie aus der Anzahl der Wasserstoffatome des Abbauproduktes hervorgeht, kein

21) Windaus und Schneckenburger, B. 46, 2628 (1913).

hydrierter Ring aufgespalten worden. Dieser Befund beweist, daß die beiden Oxyd-Sauerstoffatome an der Seitenkette haften.



I. Lacton-dicarbonsäure $C_{22}H_{32}O_6$ II. Keto-lacton $C_{21}H_{30}O_3$

Die Lacton-dicarbonsäure $C_{22}H_{32}O_6$ (I) titriert sich in der Kälte zweibasisch und in der Wärme dreibasisch. Bei der Brenzreaktion liefert sie unter Abspaltung von Kohlendioxyd und Wasser ein Keto-lacton $C_{21}H_{30}O_3$ (II).

Hierdurch wird bewiesen, daß die beiden benachbarten Alkoholgruppen im Ring A stehen, da nur solche Dicarbonsäuren, die durch Aufsprengung von Ring A entstehen, bei der Brenzreaktion in cyclische Ketone überzugehen vermögen.

Wenn man das Gitogenin mit Eisessig und Salzsäure erhitzt, wird die gesamte Seitenkette abgespalten. Man erhält eine flüchtige Substanz, die ein Monosemicarbazon bildet; dieses besitzt die Formel $C_9H_{17}O_3N_3$ und das zugrunde liegende Keton (oder der Aldehyd) hat die Formel $C_8H_{14}O_3$[6]).

G i t o n i n: 100 g Digitonin-Merck werden in 3 l 95proz. Alkohol in der Hitze gelöst und unter Schutz vor Verdunstung stehen gelassen. Im Laufe mehrerer Wochen scheidet sich eine reichliche Menge amorphen Materials aus, das abgesaugt und zur weiteren Reinigung aus wenig heißem 50proz. Alkohol umgeschieden wird. Hierbei fällt das neue Glucosid in weißen amorphen Kugeln aus; wenn sich in diesem Material noch die charakteristischen Nadeln des Digitonins vorfinden (Prüfung unter dem Mikroskop!), muß das Umlösen wiederholt werden. Zers. 272°, Gelbfärbung ab 255°. Gitonin ist schwer löslich in Wasser, Methanol und Aethanol, unlöslich in Aceton und Äther; $[\alpha]_D^{20}$ — 50,7° (Pyridin)[21]).

G i t o g e n i n: Aus Gitonin durch Erhitzen mit alkoholischer Salzsäure. Beim vorsichtigen Verdünnen der Lösung scheidet sich das Gitogenin in Form langer Nadelbüschel ab. Das Material muß solange aus Benzol oder Alkohol umkristallisiert werden, bis es scharf bei 271—272° schmilzt. Das reine Gitogenin bildet schmale Blättchen und ist leicht löslich in Chloroform, heißem Alkohol, schwer löslich in kaltem Eisessig und in Äther, unlöslich

in Wasser. Diacetyl-gitogenin, durch Kochen mit Essigsäureanhydrid, lange Nadeln aus Petroläther vom Schmp. 243—244°. Dipropionyl-gitogenin, durch Erhitzen mit Propionsäureanhydrid, schmale Blättchen aus Petroläther oder Alkohol, Schmp. 195—196°[21]).

Gitogensäure $C_{27}H_{42}O_6$: 5 g Gitogenin werden in 100 ccm Eisessig gelöst und allmählich mit 40 ccm Kilianischer Chromsäuremischung versetzt; die Dicarbonsäure beginnt nach kurzem Stehen auszukristallisieren. Aus verd. Essigsäure kristallisiert die Gitogensäure in Blättchen oder Tafeln, die bei 242—243° schmelzen. Dimethylester, mit Diazomethan, Blättchen aus Methanol, Schmp. 145—146°; $[\alpha]_D^{19}$ —63,0° (Chloroform)[21]).

Lacton-dicarbonsäure $C_{22}H_{32}O_6$ (I): Gitogensäure wird mit rauchender Salpetersäure oxydiert. Aus Eisessig-Wasser erhält man die Säure als Filzwerk feiner Nadeln, Schmp. 238°. Dimethylester, Tafeln aus Alkohol oder Äther-Petroläther, Schmp. 134°[22]).

Keto-lacton $C_{21}H_{30}O_3$ (II): I wird in einer Retorte 20 Minuten mit Essigsäureanhydrid gekocht. Nach Abdestillieren des Essigsäureanhydrids (zuletzt i. V.) wird bei 3 mm und 280° destilliert. Das Destillat wird zunächst aus Eisessig-Wasser, dann aus Methanol-Wasser umkristallisiert, Nadeln vom Schmp. 226°. Oxim, Nadelbüschel aus verd. Methanol, Schmp. 250° (Zers.)[22]).

B II c. Tigogenin[3])

Das Digitonin und in kleinerer Menge das Gitonin sind, wie vorangehend geschildert wurde, die Hauptsaponine der Digitalissamen. Aber schon ältere Beobachtungen von Windaus hatten die Anwesenheit von weiteren Saponinen angezeigt. Diese Nebensaponine konnten aber zunächst nicht als solche gefaßt werden, sondern wurden in Gestalt charakteristischer neutraler Oxydationsprodukte, von Ketonen, nachgewiesen.

Bei der Chromsäureoxydation von ganz reinem Digitogenin und Gitogenin erhält man nur saure Produkte, die Dicarbonsäuren Digitogensäure bzw. Gitogensäure. Wenn man in derselben Weise Digitogenin aus Rohdigitonin oxydiert, erhält man etwa 10% neutrale Produkte, die sich auch durch eine zweite, unter gleichen Bedingungen ausgeführte Oxydation nicht in Digitogensäure oder Gitogensäure überführen lassen. Aus diesem neutralen Anteil läßt sich in geringer Menge ein schön kristallisierter Stoff von der Formel $C_{27}H_{40}O_4$ isolieren. Der neue Stoff enthält zwei Ketogruppen, denn er liefert ein Dioxim; die beiden anderen Sauerstoffatome sind vermutlich oxydartig gebunden. Wahrscheinlich handelt es sich um das Oxydationsprodukt eines zweiwertigen Alkohols $C_{27}H_{44}O_4$. Dieser Alkohol würde ein Isomeres des Gitogenins sein und die beiden Hydroxylgruppen nicht benachbart enthalten. Fernerhin findet man noch in sehr kleiner Menge ein Monoketon $C_{27}H_{42}O_3$; es schmilzt

[22]) Windaus und Linsert, H. 147, 275 (1925).

bei 203° und ist wahrscheinlich das Oxydationsprodukt eines einwertigen Alkohols $C_{27}H_{44}O_3$. Dieser enthält eine Hydroxylgruppe weniger als Gitogenin und besitzt dieselbe Formel wie Parigenin. Unter den Agluconen der Digitalissaponine ist also das Hauptprodukt ein dreiwertiger Alkohol $C_{27}H_{44}O_5$, in geringer Menge sind zwei zweiwertige Alkohole $C_{27}H_{44}O_4$ und in Spuren ein einwertiger Alkohol $C_{27}H_{44}O_3$ vorhanden.

Jacobs und Fleck[3]) ist es später gelungen, diesen einwertigen Alkohol $C_{27}H_{44}O_3$, der den Namen Tigogenin erhalten hat, durch fraktionierte Kristallisation von rohem Gitogenin aus Digitalis-Blättern in reinem Zustande darzustellen, indem sie von der größeren Löslichkeit des Tigogenins in Petroläther Gebrauch machten. Das Tigogenin ist ein einwertiger Alkohol und liefert bei der Chromsäureoxydation ein Keton, das nach seinen Eigenschaften wahrscheinlich mit dem von Windaus und Willerding[1]) dargestellten Keton identisch ist*).

Tschesche[7]) hat die sehr einfachen Beziehungen dieses Sapogenins zum Gitogenin und damit auch zum Digitogenin aufgedeckt. Wenn man Tigogenin mit Chromsäure oxydiert, erhält man unter anderem eine Dicarbonsäure, die mit Gitogensäure identisch ist. Tigogenin ist also eine Monohydroxy-Verbindung des gleichen Grundkörpers, der auch dem Gitogenin und dem Digitogenin zu Grunde liegt. Es enthält die eine Hydroxylgruppe an der gleichen Stelle, an der sich auch eine der Hydroxylgruppen des Gitogenins und des Digitogenins befindet.

Tschesche und Hagedorn[9]) ist es weiterhin vor kurzem gelungen, das Tigogenin zur Aetio-allo-biliansäure abzubauen. Dies gelang auf folgendem Wege: Das Acetyl-Derivat des Tigogenins (IV) wurde energisch mit Chromsäure oxydiert. Hierbei entsteht neben einer Reihe von anderen Produkten in etwa 10% Ausbeute das Acetyl-Derivat eines Lactons $C_{22}H_{34}O_3$ (V); es sind also aus dem Molekül des Tigogenins 5 Kohlenstoffatome abgespalten worden, die aus der Seitenkette stammen. Die Verkürzung der Seitenkette beim Gitogenin und beim Digitogenin durch oxydativen Abbau ist schon von Windaus und Mitarbeitern bewerkstelligt worden; es wurden ebenfalls Lactone mit 22 C-Atomen erhalten, die ihre Lactongruppe in der Seitenkette tragen. Einen ähnlichen Abbau haben neuerdings Simpson und Jacobs am Parigenin durchgeführt und sind ebenfalls unter Absprengung von 5 C-Atomen zu einem Lacton-Derivat mit 22 C-Atomen gelangt.

*) In größeren Mengen findet sich das Tigogenin als Glycosid in den Blättern von Digitalis lanata, in denen es anscheinend frei von Gitogeninglycosiden vorkommt.

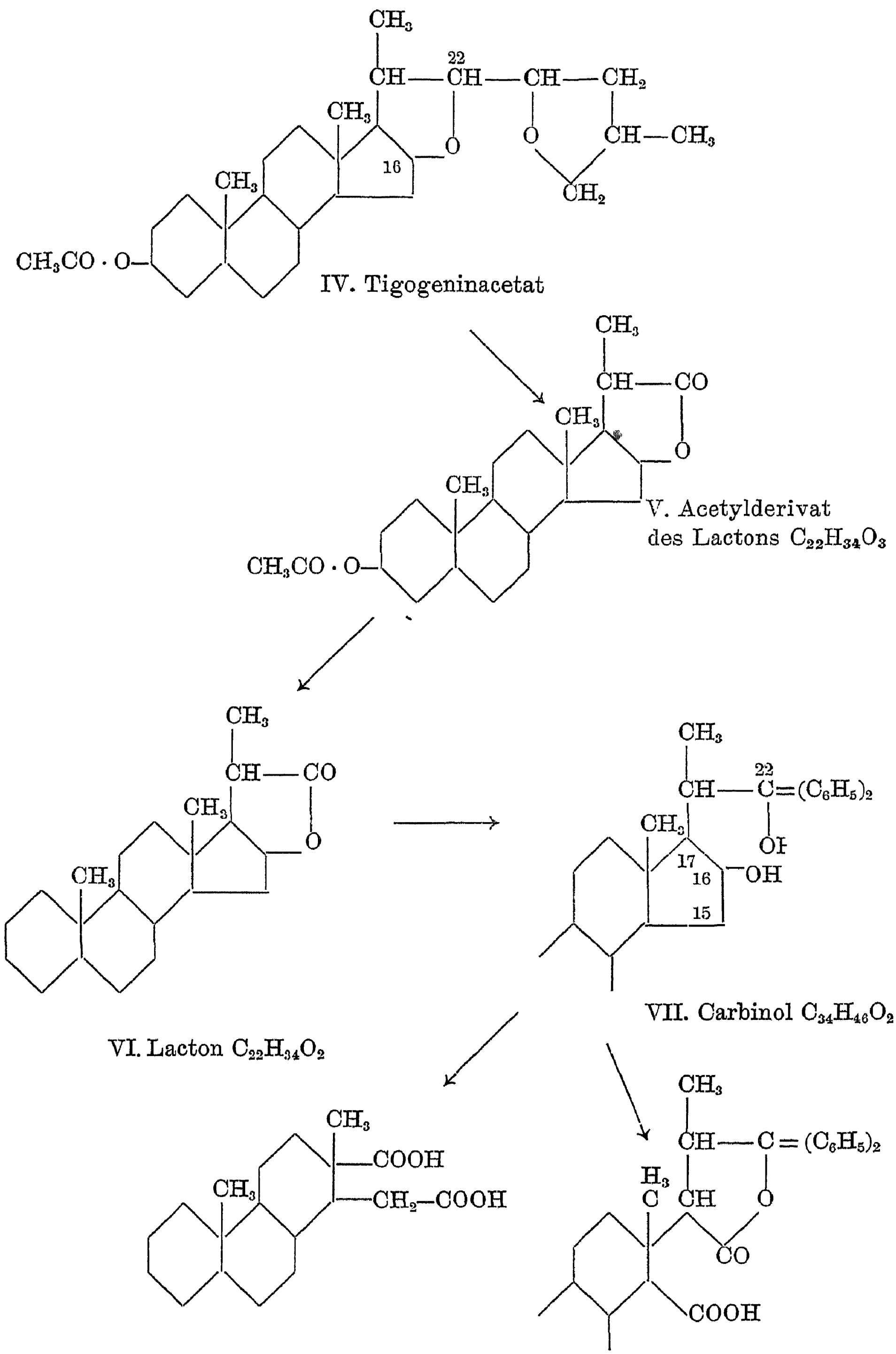
Das Lacton $C_{22}H_{34}O_3$ aus Tigogenin wird in der Kälte durch Natronlauge nicht verseift. Es gelingt auch nicht, nach Aufspaltung des Lactonringes die entsprechende freie Oxy-Säure zu erhalten, da sich beim Ansäuern sofort das Ausgangslacton zurückbildet. Die Beständigkeit des Lactonringes spricht dafür, daß es sich um ein Fünfringlacton handelt.

Das Acetoxy-Lacton (V) wird zum weiteren Abbau entacetyliert und das freie Oxy-lacton durch Chromsäureoxydation in ein Keto-Derivat und dieses durch anschließende Clemmensenreduktion in ein hydroxylfreies Lacton verwandelt. Dieses gesättigte Lacton $C_{22}H_{34}O_2$ (VI) wurde dann mit Phenyl-magnesium-bromid in ein Diphenyl-carbinol $C_{34}H_{46}O_2$ (VII) übergeführt. Das Carbinol enthält zwei freie Hydroxylgruppen. Bei der Grignardreaktion ist der Lactonring unter Freilegung der Hydroxylgruppe geöffnet worden und aus der Carboxylgruppe ist in normaler Reaktion das tertiäre Carbinol entstanden.

Das Carbinol $C_{34}H_{46}O_2$ besitzt die Eigenschaft, unter Wasserabspaltung einen neuen Sauerstoffring zu bilden; das hierbei entstehende Furan-Derivat enthält keine aktiven Wasserstoffatome mehr. Die leicht verlaufende Ringbildung spricht ebenfalls dafür, daß die beiden Hydroxyle in 1-4-Stellung zueinander stehen.

Das Carbinol $C_{34}H_{46}O_2$ (VII) wurde der Chromsäureoxydation unterworfen, wobei neben anderen Abbauprodukten zwei Säuren der Formel $C_{19}H_{30}O_4$ (VIII) und $C_{34}H_{42}O_4$ (IX) gebildet wurden. Die Säure $C_{19}H_{30}O_4$ (VIII) erwies sich in allen Eigenschaften als identisch mit der Aetio-allo-biliansäure. Hiermit ist der gesuchte Zusammenhang der neutralen Sapogenine mit den Gallensäuren hergestellt und es folgt hieraus ferner eindeutig, daß die Genine der neutralen Saponine 27 Kohlenstoffatome enthalten. Der eben dargelegte Abbau des Tigogenins kann durch folgende Formeln wiedergegeben werden.

Die Verlegung des 2. Sauerstoffringes zwischen die Kohlenstoffatome 16 und 22, eine Formulierung, die auch von Simpson und Jacobs bevorzugt wird, gestattet die Bildung der Säure $C_{34}H_{42}O_4$ zu erklären. Bei der Chromsäureoxydation ist in diesem Falle der Ring D des Gallensäureringsystems zwischen den C-Atomen 15 und 16 aufgesprengt worden, wobei die aus C_{16} neu entstandene Carboxylgruppe mit dem Hydroxyl der tertiären Carbinolgruppe einen neuen Lactonring gebildet hat. Diese Säure liefert bei der Weiteroxydation keine Aetio-allo-biliansäure, kann also auch nicht Zwischenprodukt beim Abbau zur Aetio-allo-biliansäure sein. Die völlige Sicherstellung der Konstitution der Abbausäure $C_{34}H_{42}O_4$, wie sie in der Formulierung IX wieder-



IV. Tigogeninacetat

V. Acetylderivat des Lactons $C_{22}H_{34}O_3$

VI. Lacton $C_{22}H_{34}O_2$

VII. Carbinol $C_{34}H_{46}O_2$

VIII. Aetio-allo-biliansäure

IX. Säure $C_{34}H_{42}O_4$

gegeben ist, würde auch beweisen, daß die Seitenkette der neutralen Sapogenine ebenfalls am C-Atom 17 angreift wie die Seitenkette der Sterine und Gallensäuren.

Wenn es richtig ist, daß die sekundäre Hydroxylgruppe des Tigogenins am C-Atom 3 haftet (daß sie im Ring A steht, wird durch die Bildung eines Brenzketons aus Gitogensäure bewiesen, s. S. 165), kann man es als wahrscheinlich ansehen, daß sich das Tigogenin vom Allocholantypus ableitet; würde sie am C-Atom 4 sitzen, so wäre eine Umlagerung am C-Atom 5 bei der Clemmensen-Reduktion des Ketolactons $C_{22}H_{32}O_3$ nicht ausgeschlossen.

T i g o g e n i n: s. [3]) Rohes Gitogenin aus Digitalisblättern vom Schmp. 240—250° wird in Chloroform gelöst und die bei Zimmertemp. gesättigte Lösung mit 2 Teilen Petroläther (40—60°) versetzt. Der Niederschlag von Gitogenin wird abfiltriert. Die eingedampfte Mutterlauge wird in wenig Chloroform gelöst und in der gleichen Weise mit Petroläther behandelt, bis kein Gitogenin-Niederschlag mehr entsteht. Der lösliche Anteil wird schließlich mehrmals aus Aceton umkristallisiert und liefert das Tigogenin in Prismen vom Schmp. 203—204°. Tigogenin ist leichter löslich in Aceton, Äther, Petroläther als Gitogenin; diese Löslichkeitsdifferenz ist beim Petroläther am ausgeprägtesten; $[\alpha]_D^{25} - 49°$ (Pyridin). T i g o g e n i n - a c e t a t, Kristalle aus Alkohol, Schmp. 200—202°. T i g o g e n i n - b e n z o a t, Platten aus Aceton, Schmp. 224—225°.

T i g o g e n o n: Aus Tigogenin durch Chromsäureoxydation, Platten aus Aceton, Schmp. 206—207°; $[\alpha]_D^{24} - 35°$ (Pyridin). O x i m, Nadeln aus Aceton, Schmp. 256—258° (Zers.).

L a c t o n $C_{22}H_{34}O_3$ (V)[9]): Tigogenin-acetat wird in Eisessiglösung mit Chromsäureanhydrid bei 95—100° oxydiert. Das Reaktionsprodukt wird in saure und neutrale Anteile zerlegt und die neutralen Anteile aus verd. Alkohol umkristallisiert. Man erhält das Acetat des Lactons V in Nadeln vom Schmp. 219°; $[\alpha]_D^{18} - 49{,}5°$ (Chloroform). Durch alkalische Verseifung erhält man hieraus das freie Lacton $C_{22}H_{34}O_3$ (V), Nadeln aus Alkohol, Schmp. 233,5°; $[\alpha]_D^{18} - 41{,}2°$ (Chloroform).

K e t o - l a c t o n $C_{22}H_{32}O_3$[9]): Aus V durch Chromsäureoxydation bei Zimmertemp. Prismen aus Aceton, Schmp. 254°; $[\alpha]_D^{18} - 22{,}8°$ (Chloroform).

L a c t o n $C_{22}H_{34}O_2$ (VI)[9]): Durch achtstündiges Erhitzen des Ketolactons in alkoholischer Lösung mit amalgamiertem Zink und konz. Salzsäure. Das Reduktionsprodukt kristallisiert aus Methanol in Nadeln vom Schmp. 199°; $[\alpha]_D^{18} - 44{,}4°$ (Chloroform).

C a r b i n o l $C_{34}H_{46}O_2$ (VII)[9]): VI wird in ätherischer Lösung mit Phenylmagnesiumbromid umgesetzt und das Reaktionsprodukt, nach Zerlegung mit Eis und verd. Schwefelsäure, mit Essigsäureanhydrid aufgekocht. Das sich hierbei abscheidende Carbinol (VII) wird aus Petroläther umkristallisiert, Schmp. 211—212°.

Säure IX: VII wird in Eisessiglösung mit Chromsäureanhydrid oxydiert. Die ätherische Lösung der Oxydationsprodukte wird mit 2 n-Natronlauge durchgeschüttelt, wobei sich ein schwer lösliches Natronsalz abscheidet. Die aus dem schwer löslichen Natronsalz erhaltene Säure IX wird aus Eisessig umkristallisiert, Sintern bei 132—133°, Schmp. 216—217°. Der Methylester der Säure IX bildet Nadeln vom Schmp. 189,5°. Die Aetio-allo-biliansäure VIII findet sich als leicht lösliches Natronsalz in der alkalisch-wäßrigen Lösung und wird durch Ansäuern und Ausäthern isoliert; Umkristallisieren aus Eisessig, Zers. 253—254°.

B II d. Parigenin (Sarsasapogenin)

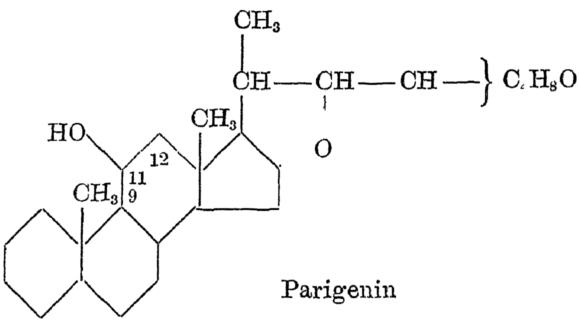
Die Saponine der Sarsaparilla-Wurzel liefern bei der Hydrolyse ein kristallisiertes Aglucon, das Parigenin oder Sarsasapogenin[4]). Das Parigenin hat die Formel $C_{27}H_{44}O_3$. Es enthält eine sekundäre Alkoholgruppe, denn es läßt sich in Monoacyl-Derivate überführen und liefert bei der Chromsäureoxydation ein Monoketon, das Parigenon (Sarsasapogenon). Die beiden übrigen Sauerstoffatome lassen sich nicht charakterisieren und haben sicher oxydische Funktion wie bei den anderen Sapogeninen. Das Parigenin ist gesättigt und ist isomer mit Tigogenin. Bei der Selendehydrierung liefert es das γ-Methyl-cyclopenteno-phenanthren, besitzt also höchstwahrscheinlich dasselbe Vierringsystem wie die Sterine und Gallensäuren. Wird Parigenin mit einer Mischung von Eisessig und Salzsäure erhitzt, so spaltet es ein Keton $C_8H_{14}O_3$ ab, das der Seitenkette entstammt und das mit dem nach der gleichen Methode aus Gitogenin erhaltenen Keton $C_8H_{14}O_3$ identisch ist. Hieraus läßt sich schließen, daß die Seitenketten der neutralen Sapogenine gleichen Bau besitzen.

Bei der Oxydation von Parigenin oder seines Ketons mit alkalischer Bromlösung haben Simpson und Jacobs eine zweibasische Säure von der Zusammensetzung $C_{27}H_{42}O_6$ erhalten. Dieselbe Säure erhält man auch durch milde Oxydation mit Chromsäure. In letzterem Falle entsteht außerdem eine Ketocarbonsäure $C_{27}H_{40}O_5$. Auf Grund dieser Befunde wird auf das Vorliegen einer Gruppe

$$-CH_2-CH\cdot OH-CH=$$

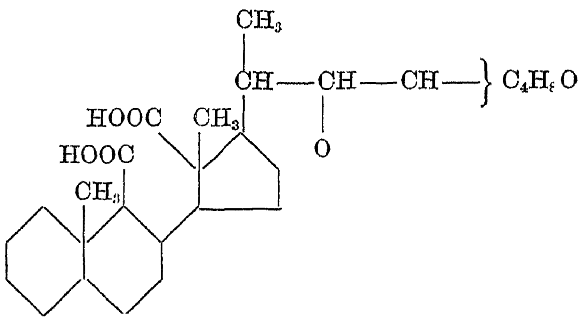
geschlossen.

Die Estergruppen der beiden Abbausäuren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Verseifbarkeit. Der Ketomono-ester ist leicht verseifbar; im Di-ester wird durch 4stündiges Kochen mit 0,5 n-Alkali nur eine Estergruppe verseift, die zweite Estergruppe ist gegen Verseifung sehr beständig. Unter Berücksichtigung aller Befunde schlagen Simpson und Jacobs für das Parigenin folgende Konstitutionsformel vor:



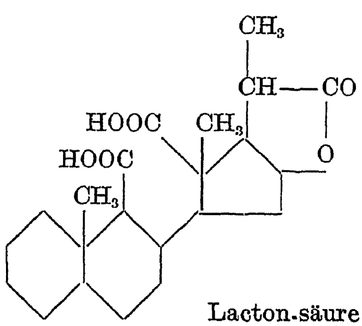
Parigenin

Die Dicarbonsäure $C_{27}H_{42}O_6$, die aus Parigenin durch Oxydation entsteht, wird folgendermaßen formuliert:



Bei der Chromsäureoxydation wird der hydroxylhaltige Ring nicht nur zwischen den C-Atomen 11 und 12, sondern auch zu einem Teil zwischen den C-Atomen 9 und 11 aufgesprengt; der letztere Reaktionsverlauf führt zu der Ketocarbonsäure $C_{27}H_{40}O_5$.

Wenn man die zweibasische Säure mit rauchender Salpetersäure oxydiert, erhält man unter Abspaltung von 5 C-Atomen aus der Seitenkette eine zweibasische Lacton-Säure $C_{22}H_{32}O_6$:



Lacton-säure $C_{22}H_{32}O_6$

P a r i g e n i n, Kristalle aus Aceton, Schmp. 199—199,5°.

P a r i g e n o n: Aus Parigenin durch Chromsäureoxydation, Platten aus Aceton, Schmp. 220—222°; $[\alpha]_D^{25}$ — 46° (Pyridin); O x i m, Platten aus Aceton, Schmp. 126—128°.

K e t o n $C_8H_{14}O_3$: Aus Parigenin durch Erhitzen mit Eisessig-Salzsäure; Semicarbazon $C_9H_{17}O_3N_3$, Rhomben aus Äther-Petroläther, Schmp. 119,5—120°.

D i c a r b o n s ä u r e $C_{27}H_{42}O_6$: Aus Parigenin durch Oxydation mit alkalischer Bromlösung, Nadeln aus Essigsäure, Schmp. 280° (Zers.); Dimethylester, Platten aus Chloroform-Methanol, Schmp. 216—217°.

K e t o s ä u r e $C_{27}H_{40}O_5$: Aus Parigenin durch Chromsäureoxydation (enthält eine neugebildete Doppelbindung), Platten aus Isopropyläther, Schmp. 161—162°. Methylester, Platten aus wäßrigem Methanol, Schmp. 123 bis 124°.

C. Die Herzgifte

C I. Einleitung

Die Herzgifte sind, mit Ausnahme der in ihrer Wirkung digitalisähnlichen Krötengifte, sämtlich pflanzlichen Ursprungs. Die Pflanzen, in denen man Herzgifte findet, sind ihrer Anzahl nach beschränkt, aber geographisch sehr weit verbreitet. Von den pflanzlichen Familien, die Herzgifte führen, sind vor allem zu nennen die Apocynaceen und Scrophulariaceen, ferner die Ranunculariaceen und Liliaceen, und von den bei uns einheimischen Pflanzen der Fingerhut, Digitalis purpurea, und das Maiglöckchen, Convallaria majalis.

Die Forschungen der letzten Jahrzehnte haben uns eine genaue Kenntnis vom Aufbau der pflanzlichen Herzgifte vermittelt. Der Konstitutionsaufklärung dieser Stoffe standen lange Zeit hauptsächlich zwei Schwierigkeiten im Wege. Erstens gelang es erst nach vieler Mühe, die einzelnen Vertreter dieser Gruppe in völlig reinem und einheitlichem Zustande darzustellen, und zweitens hat es außerordentliche Schwierigkeiten bereitet, die richtigen Molekularformeln der Herzgifte zu ermitteln. Nachdem diese Probleme gelöst waren, bedeutete es einen weiteren Fortschritt, als es gelang, konstitutionelle Zusammenhänge zwischen einer Reihe von wichtigen Herzgiften aufzudecken. Schließlich konnte man eindeutige strukturelle Beziehungen dieser Stoffklasse zu den Sterinen klarlegen und damit die Lösung der wesentlichsten Fragen des Konstitutionsproblems ermöglichen.

Alle bisher aufgefundenen pflanzlichen Herzgifte sind Glycoside. Durch Hydrolyse mit Mineralsäuren zerfallen sie in die zuckerfreien Spaltstücke, die sog. Aglucone oder Genine, und in ein oder mehrere Moleküle Zucker. Die Genine zeigen eine auffallende Ähnlichkeit in Zusammensetzung, Eigenschaften und chemischer Reaktionsweise. Sie sind meistens aus 23 Kohlenstoffatomen aufgebaut; eine Ausnahme macht das Scillaridin A, das nach Stolls Untersuchungen 24 Kohlenstoffatome besitzt. Sie besitzen ferner ein hydriertes, tetracyclisches Kohlenstoffgerüst wie die Sterine und Gallensäuren und enthalten sämtlich eine Enol-lacton-gruppe, deren Doppelbindung sich leicht hydrieren läßt. An

verschiedenen Stellen des Ringsystems befinden sich außerdem mehrere Hydroxylgruppen und manchmal eine CO-Gruppe. Unter der Einwirkung von Alkalien werden die Genine in isomere Verbindungen umgelagert; beim Behandeln mit Chlorwasserstoffsäure gehen sie unter Wasserabspaltung in mehrfach ungesättigte Mono-oxy-lactone über. Mit Nitroprussid-natrium und Alkali geben sowohl die Herzgifte als auch deren Genine eine charakteristische Rotfärbung, den sog. Legal-Test. Auch hierin bilden die Scilla-Glycoside eine Ausnahme; sie geben diese Farbreaktion nicht.

An die Gruppierung des Enol-lactons ist die physiologische Wirksamkeit eng geknüpft. Variationen an dieser Gruppierung, Hydrierung der Doppelbindung oder die Isomerisierung mit Alkali, lassen die Wirksamkeit herabsinken oder ganz verschwinden.

Als Zuckerkomponenten finden wir hauptsächlich Glucose, Digitalose, Digitoxose und Cymarose, bzw. Biosen aus den genannten Monosacchariden. Digitalose, Digitoxose und Cymarose sind die ersten natürlich aufgefundenen Vertreter von Desoxyzuckern und Methyläther-desoxyzuckern.

Schon Windaus[1]) hat in seiner Arbeit über das Cymarin darauf hingewiesen, daß viele Herzgifte chemisch miteinander nahe verwandt zu sein scheinen: „Es scheint, daß diese zuckerfreien Spaltstücke (Antiarigenin, Digitoxigenin, Digitaligenin und Strophanthidin) ein sehr ähnliches Kohlenstoffskelett besitzen, das bei den einzelnen Verbindungen nur in verschieden hohem Grade mit Sauerstoff beladen ist.“ Später ist es dann Jacobs und seinen Mitarbeitern gelungen, die chemische Verwandtschaft für eine Reihe von Herzgift-Geninen zu beweisen.

Schwierigkeiten der Reindarstellung. Die wirksamen Extrakte aus den pflanzlichen Materialien stellen außerordentlich komplizierte Gemische dar. Außer meist mehreren Herzgiftglycosiden sind neben einer Reihe unbekannter Begleitstoffe noch die durch Cholesterin fällbaren Saponine, vor allem das Digitonin und das Gitonin, und weiterhin eine große Menge durch Cholesterin nicht fällbarer Saponine vorhanden. Die Saponine, die keine kardiotonische Wirkung besitzen, verursachen durch ihre Eigenschaft kolloidale, seifenähnliche Lösungen zu bilden, eine weitgehende Veränderung der Löslichkeitseigenschaften der Herzgifte. Auch ist es nicht ausgeschlossen, daß die Herzgifte mit anderen Bestandteilen des Gemisches leicht lösliche, lockere Anlagerungsverbindungen eingehen, die erst beim Behandeln mit bestimmten Lösungsmitteln in ihre Komponenten zerlegt werden. Das Digitalin z. B. läßt sich zunächst aus den Digitalissamen mit Wasser vollständig extrahieren, ist aber schließlich, wenn es in kristallisierter Form vorliegt, in Wasser kaum löslich. Dieselbe Veränderung der Löslichkeit tritt noch auffälliger beim Gitoxin in Erscheinung. Diese Erscheinung hat zu

[1]) B. 48, 992 (1915).

mancherlei Irrtümern und unrichtigen Hypothesen Anlaß gegeben. Die relativ kleinen Mengen an Herzgiften, die durchschnittlich in den Pflanzen vorkommen, haben die Schwierigkeiten der Reindarstellung noch vergrößert.

Noch ein Grund erschwert die Isolierung einheitlicher chemischer Individuen. Die große Empfindlichkeit der Herzgiftglycoside gegenüber Säuren, Basen und Enzymen bringt es mit sich, daß die wirksamen Stoffe im Verlaufe ihrer Isolierung ohne Beachtung besonderer Vorsichtsmaßregeln sehr rasch mannigfachen Veränderungen und Zersetzungen unterliegen. Erst in den letzten Jahren ist es gelungen, die in der Digitalis purpurea und in der Digitalis lanata ursprünglich vorhandenen, genuinen Herzgiftglycoside zu isolieren.

Schwierigkeiten der Ermittlung der Molekularformel. Die Formeln der Herzgiftglycoside und ihrer Spaltprodukte mußten wie kaum bei anderen Verbindungen viele Male einer Revision unterzogen werden. Hauptsächlich hat die Unreinheit und Uneinheitlichkeit der im ersten Stadium der chemischen Bearbeitung untersuchten Stoffe zu zahlreichen falschen Formeln Anlaß gegeben. Aber auch die reinen Stoffe sind schwierig zu analysieren und die erhaltenen Analysenzahlen nicht ohne weiteres richtig zu deuten, da der Unterschied für eine CH_2-Gruppe gering ist und viele der untersuchten Verbindungen die unangenehme Eigenschaft besitzen, mit wechselnden Mengen von Lösungsmitteln auszukristallisieren. Das Kristalllösungsmittel ist häufig nur schwierig und unvollkommen und oft nur unter Zersetzung der Substanz zu entfernen; viele der getrockneten Stoffe ziehen an der Luft rasch wieder Feuchtigkeit an. Diese Eigenschaft erschwert auch die Ermittlung des Molekulargewichts. Windaus schreibt: „Molekulargewichtsbestimmungen auf physikalischem Wege geben hier meist unsichere Resultate, weil die in Wasser wenig löslichen Stoffe häufig sehr hygroskopisch sind und neben Kristallwasser noch andere Kristall-Lösungsmittel enthalten.“ Hier gelingt es mit Hilfe der von Windaus angewandten Lacton-Titration zu richtigen Werten zu kommen. Die zuckerfreien Spaltprodukte der Herzgifte sowie auch die Glycoside selbst lassen sich in der Wärme mit Lauge titrieren, wobei unter Aufspaltung der Lactongruppe ein Mol Alkali verbraucht wird. Diese Reaktion verläuft so glatt, daß sie sehr gut zur Bestimmung der Molekülgröße verwendet werden kann. Einen weiteren Anhaltspunkt über die Größe des Molekulargewichts liefert der Umstand, daß einige Glycoside Methoxyl enthalten (in der Zuckerkomponente); aus dem Methoxylgehalt kann man gleichfalls ein Mindest-Molekulargewicht berechnen.

Im Laufe der Zeit sind eine ganze Reihe verschiedener Herzgifte isoliert worden, von denen die wichtigsten und genauer untersuchten in folgender Tabelle zusammengestellt sind:

Purpureaglycoside A und B bzw. Digitoxin und Gitoxin	aus den Blättern von Digitalis purpurea
Digitalin	„ den Früchten von Digitalis purpurea
Digilanide A, B und C bzw. Digoxin	„ Digitalis lanata
Oleandrin	„ Nerium oleander

Cymarin	aus	Apocynum cannabinum
K-Strophanthin-β	„	Strophanthus kombé
Periplocymarin	„	Periploca graeca
Oùabain	„	Strophanthus gratus
Sarmentocymarin	„	Strophanthus sarmentosus
Uzarin	„	einer Gomphocarpus-Art
Scillaren A	„	Scilla maritima

Daneben gibt es noch eine Anzahl weiterer Herzgifte, über die wir aber noch nicht gut unterrichtet sind. Es seien erwähnt:

Convallatoxin	aus	Convallaria majalis
Antiarin	„	Antiaria toxicaria
Adonidin	„	Adonis vernalis.

Die nächste Tabelle bringt eine Zusammenstellung der wichtigsten, aus den Herzgiften dargestellten Genine:

Gitoxigenin	$C_{23}H_{34}O_5$	aus	Gitoxin
Digitoxigenin	$C_{23}H_{34}O_4$	„	Digitoxin
Digoxigenin	$C_{23}H_{34}O_5$	„	Digoxin
Periplogenin	$C_{23}H_{34}O_5$	„	Periplocymarin
Uzarigenin	$C_{23}H_{34}O_4$	„	Uzarin
Sarmentogenin	$C_{23}H_{34}O_5$	„	Sarmentocymarin
Strophantidin	$C_{23}H_{32}O_6$	„	verschiedenen Strophanthinen
Oùabagenin	$C_{23}H_{34}O_8$	„	Oùabain
Scillaridin A	$C_{24}H_{30}O_3$	„	Scillaren A

C II. Die einzelnen pflanzlichen Herzgifte

C II a. Gitoxigenin-glycoside: Gitoxin, Digitalin, Purpureaglycosid B, Digilanid B, Acetyl-gitoxin und Oleandrin

Gitoxin[2][3])

Wenn man Digitalisblätter mit kaltem Wasser behandelt, werden etwa ¾ der vorhandenen Giftstoffe in Lösung gebracht. Der wäßrige Extrakt enthält ein Gemisch von Giftstoffen, dem man durch Ausschütteln mit Chloroform das Gitoxin entziehen kann. In reinem Zustande besitzt das Glycosid eine sehr geringe Löslichkeit in Chloroform, Wasser und Alkohol. Gitoxin, dessen vollständige Reindarstellung sehr schwie-

[2]) Windaus u. Schwarte, B. 58, 1515 (1925).

[3]) Windaus, Westphal u. Stein, B. 61, 1847 (1928).

rig ist, ist der wesentliche Bestandteil von Krafts Anhydro-gitalin und Cloettas Bigitalin.

Die endgültige Formel des Gitoxins wurde von Windaus ermittelt. Durch Einwirkung von Mineralsäuren wird das Glycosid in Gitoxigenin und Digitoxose gespalten (Formel s. Tab. I).

Das Aglucon Gitoxigenin ist ein einfach ungesättigtes Trioxy-lacton; die Digitoxose ist ein α-Desoxyzucker der Formel $C_6H_{12}O_4$. Wird das Gitoxigenin mit konzentrierter Salzsäure behandelt, so verliert es leicht 2 Mol Wasser und geht in ein dreifach ungesättigtes Monooxy-lacton, das Dianhydro-gitoxigenin, über. Eine Reihe von Umwandlungsprodukten des Gitoxigenins sind in Tabelle II zusammengestellt.

Digitalin

Aus den Digitalissamen lassen sich mit Wasser die gesamten wirksamen Stoffe ausschütteln. Der wäßrige Auszug enthält das Digitalin, auch Digitalinum verum genannt; es ist in Chloroform praktisch unlöslich. Nach erfolgter Abscheidung aus der wäßrigen Lösung ist es auch in Wasser schwer löslich. Das Digitalin ist das einzige gut charakterisierte Herzgift, das man aus den Samen von Digitalis purpurea isoliert hat. Es ist zuerst von Schmiedeberg[4]) und Kiliani[5]), später von Windaus[6]) untersucht worden.

Bei der Spaltung mit Mineralsäuren erhält man aus dem Digitalin das Digitaligenin und ferner neben Glucose die Digitalose; die Digitalose ist der Methyläther einer Methylpentose und besitzt die Formel $C_7H_{14}O_5$. Das Digitaligenin ist, wie Windaus und Schwarte[2]) gefunden haben, identisch mit dem Dianhydro-gitoxigenin aus Gitoxin. Hiermit ist der strukturelle Zusammenhang der beiden Herzgifte Gitoxin und Digitalin bewiesen.

Windaus[7]) hat die Spaltungsreaktion des Digitalins folgendermaßen erklärt. Aus dem Digitalin, das nur eine Doppelbindung besitzt (Bildung des physiologisch inaktiven Dihydro-digitalins[8])), entsteht durch Behandeln mit Mineralsäuren unter Abspaltung der Zuckerbestandteile zunächst ein Genin $C_{23}H_{34}O_5$, ein einfach ungesättigtes Trioxy-lacton. Unter den energischen Bedingungen, die im Gegensatz zum Gitoxin bei der Hydrolyse des Digitalins angewendet werden müssen,

[4]) Schmiedeberg, Arch. Pharm. 3, 16 (1874).

[5]) Kiliani, Arch. Pharm. 230, 250 (1892); B. 31, 2460 (1898); Arch. Pharm. 252, 26 (1914).

[6]) Windaus u. Bandte, B. 56, 2001 (1923).

[7]) Windaus, Arch. exp. Path. Pharm. 135, 253 (1928).

[8]) Windaus, Bohne u. Schwieger, B. 57, 1386 (1924).

läßt sich jedoch das primäre Spaltprodukt nicht fassen; es geht sofort unter Abspaltung von 2 Mol Wasser in ein dreifach ungesättigtes Dianhydro-Derivat, das Digitaligenin = Dianhydro-gitoxigenin, über. Gitoxigenin und Digitaligenin besitzen somit das gleiche Kohlenstoffskelett. Es ist ferner sehr wahrscheinlich, daß auch die Stellung der Hydroxylgruppen in dem ursprünglichen, unversehrten Genin des Digitalins die gleiche ist wie im Gitoxigenin, daß also die beiden Herzgifte Gitoxin und Digitalin als Geninkomponente das Gitoxigenin enthalten, das im ersteren Falle mit 3 Mol Digitoxose, im letzteren Falle mit je 1 Mol Glucose und Digitalose verbunden ist. In Tabelle II sind daher auch gleichzeitig die Umwandlungsprodukte des Digitaligenins enthalten.

Darst. des Gitoxins[2][9][10].

Die Digitalisblätter werden mit kaltem Wasser extrahiert und die Auszüge durch Fällung mit neutralem Bleiacetat gereinigt. Nach Abpressen des Bleiniederschlages und Fällen des Bleisalzüberschusses mit Natriumphosphat oder H_2S wird aus den so vorgereinigten Auszügen das Glycosid mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform-Lösung wird durch Schütteln mit trockner Soda von sauren Anteilen befreit und dann in Petroläther einlaufen gelassen. Das abgeschiedene Glycosid wird durch Umkristallisieren aus kaltem verd. Alkohol gereinigt. Durch Lösen in Chloroform und Fällen mit Petroläther erhält man ein amorphes Pulver (Krafts Gitalin-Fraktion), das sich durch Behandeln mit Essigester und dann mit einem Gemisch von Essigester und Äther weiter reinigen läßt; die jeweils ungelöst gebliebenen Anteile enthalten das Gitoxin. Zur Reinigung löst man dieses Material in einem siedenden Gemisch aus gleichen Teilen Chloroform und Methanol auf und engt die Lösung stark ein. Dieses Verfahren wird mit der jeweils abgeschiedenen Kristallfraktion mehrmals wiederholt, bis man das Gitoxin in Nadeln erhält, Zers. 266—269°; $[\alpha]_D = +3{,}54°$ (Pyridin). Wasserfrei erhält man es durch Umkristallisieren aus trockenem Pyridin-Äther.

Gitoxigenin (I). Gitoxin wird in 50proz. Alkohol unter Zusatz von 3% konz. HCl 25 Min. erwärmt. Blättchen aus verd. Methanol, Schmp. 224 bis 225° (Zers.); $[\alpha]_D = +34{,}6°$ (Methanol) unlösl. in Wasser, lösl. in Eisessig (1 : 500) (18°)[23].

Längeres Trocknen i. Vakuum über 100° bewirkt schon teilweise Wasserabspaltung. Bei der Acylierung entstehen meistens Gemische von Mono, Di- und Tri-Acyl-derivaten. Unter bestimmten Bedingungen läßt sich ein Diacetylgitoxigenin vom Schmp. 249—250° darstellen.

Dianhydro-gitoxigenin (II). I wird mit kalter konz. HCl behandelt. Nadeln aus verd. Methanol, Schmp. 209—210°. Acetat, Nadeln aus Alkohol, Schmp. 208°.

Dihydro-gitoxigenin (III). Durch Hydrierung von I mit Pt u.

[9]) Kraft, Arch. Pharm. 250, 118 (1912).

[10]) Cloetta, Arch. exp. Path. Pharm. 112, 261 (1926).

[23]) Diss. K. Westphal, Über das Gitoxin und das Oleandrin, Göttingen 1928.

H_2. Das Dihydroprodukt kristallisiert in 2 polymorphen Modifikationen vom Schmp. 212° und 241°, die sich ineinander überführen lassen. $[\alpha]_D = -48,7°$ (Methanol).

Dianhydro-dihydro-gitoxigenin (IV). Durch Behandeln von III mit alkohol. HCl. Blättchen aus Methanol, Schmp. 166°.

Tetrahydro-dianhydro-dihydro-gitoxigenin (V). Durch Hydrierung von IV mit Pt u. H_2. Aus dem Gemisch der isomeren Hydrierungsprod. läßt sich durch Umkristallisieren aus verd. Alkohol ein schwerstlösliches Produkt abtrennen, das in langen Nadeln krist. Schmp. 214°; $[\alpha]_D = +75,7°$ (Alkohol).

Tetrahydro-dianhydro-dihydro-gitoxigenon (VI). V wird in Eisessig mit kalter Beckmannscher Chromsäuremischung oxydiert. Derbe Prismen aus Alkohol, Schmp. 207°, $[\alpha]_D = +85,9°$ (Chloroform); Oxim, Schmp. 215°.

Lacton $C_{23}H_{36}O_2$ (VII). VI wird in Eisessig mit Zinkamalgam und konz. HCl erhitzt. Lange Nadeln aus Methanol, Schmp. 173°; $[\alpha]_D = +71,0°$ (Chloroform).

Lacton-dicarbonsäure (VIII). VI wird in Eisessig mit überschüssiger Chromsäuremischung 30 Min. bei 70° oxydiert. Feine Nadeln aus Aceton, Schmp. 282°; $[\alpha]_D = +100°$ (Eisessig). Dimethylester, Nadeln aus Methanol, Schmp. 163°; $[\alpha]_D = +82,3°$ (Chloroform).

Darst. des Digitalins[8]). Die mit Äther extrahierten Samen von Digitalis purpurea werden mit Alkohol extrah. und die Auszüge in der üblichen Weise mit neutralem Bleiacetat gereinigt. Aus den so vorgereinigten Auszügen werden die Rohglycoside durch Tannin gefällt. Der Niederschlag wird mit Bleioxyd oder Zinkoxyd verrieben und das getrocknete Gemenge mit absol. Alkohol extrahiert, wobei die Glycoside wieder in Lösung gehen. Die alkoholische Lösung wird stark eingeengt und darauf mit trocknem Äther versetzt, solange deutliche Niederschläge entstehen (Digitonin u. Gitonin). Die gesamte Lösung wird auf ein kleines Volumen eingedampft und das Konzentrat mit soviel Wasser versetzt, daß der Alkohol-Gehalt der Lösung 20% beträgt. Das aus dieser Mischung allmählich abgeschiedene Digitalin wird mit Äther und Chloroform extrahiert, um färbende Verunreinigungen zu entfernen. Dann extrahiert man mit Aceton. Die sich im Extraktionskolben wieder ausscheidenden groben, leicht filtrierbaren Körner werden aus Methanol-Äther umkristallisiert und dann in 2 Tln. Methanol gelöst und mit 3 Teilen Wasser wieder gefällt; Schmp. 229°.

Das Digitalin ist sehr schwer rein darzustellen; es besitzt keinen scharfen Schmp. und ist nicht gut kristallisiert, sondern bildet nur quellungsfähige Körner. Es enthält häufig noch geringe Mengen eines anderen Glycosids beigemischt, das sich nicht vom Gitoxigenin, sondern vom Digitoxigenin ableitet und bei der energischen Hydrolyse entsprechend in Anhydro-digitoxigenin übergeführt wird. Unreines Digitalin gibt bei der Chromsäureoxydation in kleiner Menge ein Keton, das Toxigenon, das man aus reinem Digitalin nicht erhält. Toxigenon entsteht dagegen in guter Ausbeute bei der Oxydation von Anhydro-digitoxigenin.

Hexa-acetyl-digitalin[11]). Aus Digitalin durch Kochen mit Essig-

[11]) Windaus u. Haack, B. 62, 475 (1929).

säureanhydrid. Das mit Aceton gefällte Prod. wird aus Essigsäureanhydrid umkristallisiert, Nadeln, Schmp. 212—213°; $[\alpha]_D = -17{,}4°$ (Chloroform); leicht löslich in Chloroform und Alkohol, unlöslich in Aceton und Wasser.

Das aus Digitalin durch Hydrierung mit Pd u. H_2 erhaltene Dihydro-digitalin[8]) ist in folgenden Dosen physiologisch unwirksam: 6 mg und 8 mg Dihydro-digitalin waren bei einem 55 g bzw. 47 g schweren Frosch ohne jede Wirkung auf das Herz, während 0,5 mg Digitalin einen 35 g schweren Frosch in 23 Min. töteten.

Digitaligenin. 1 Teil Digitalin wird in 10 Teilen 50proz. Alkohol unter Zusatz von 10% konz. HCl 1 Stunde zum Sieden erhitzt. Nadeln aus absol. Methanol, Schmp. 211—212°.

Purpureaglycosid B

Erst in neuerer Zeit ist es Stoll und Mitarbeitern[12]) gelungen, die in den Digitalisblättern vorhandenen sog. genuinen Herzgifte in unversehrtem Zustande zu isolieren. Dies gelang durch Anwendung schonender Extraktionsmethoden, die der Wirkung glucose-abspaltender Enzyme Rechnung tragen; ferner wurde unnötiges Erwärmen und jede Einwirkung von Säuren und Laugen vermieden (s. exper. T.). Nach diesem Verfahren erhält man aus den Blättern von Digitalis purpurea anstelle von Digitoxin und Gitoxin die Purpureaglycoside A und B.

Das Purpureaglycosid B zerfällt bei der totalen sauren Hydrolyse in Gitoxigenin, Digitoxose und Glucose. Stoll konnte weiterhin zeigen, daß das Purpureaglycosid B durch das in der Purpurea-Blattsubstanz vorhandene Enzym Digipurpidase in Gitoxin und Glucose gespalten wird. Hiermit ist die Entstehung des Gitoxins durch enzymatischen Abbau bewiesen.

Digilanid B

Das enzymhindernde Extraktionsverfahren wurde von Stoll und Mitarbeitern[13]) auch zur Reindarstellung der genuinen Herzgifte aus Digitalis lanata angewandt, wobei ein gut kristallisierendes Glycosidpräparat, das sog. Digilanid, erhalten wurde, das eine charakteristische und sehr intensive Digitaliswirkung auf das Herz zeigt. Das Digilanid ist nicht einheitlich, sondern kann in 3 verschiedene, isomorph kristallisierende Komponenten, die Digilanide A, B und C zerlegt werden*).

*) Vor Stoll hatten schon Mannich und Mitarbeiter[14]) aus Digitalis lanata das sogenannte Lanadigin isoliert, das wohl im wesentlichen ein Komponentengemisch der 3 Digilanide darstellt.

[12]) Stoll u. Kreis, Helv. Ch. A. 16, 1049 (1933).

[13]) Stoll u. Kreis, Helv. Ch. A. 16, 1390 (1933).

[14]) Arch. Pharm. 268, 453 (1930); 271, 393 (1933).

Das Digilanid B liefert bei der totalen Hydrolyse Gitoxigenin, Digitoxose, Glucose und als bisher unbekannte Komponente noch Essigsäure. Unter bestimmten Bedingungen erhält man neben Digitoxose eine neue Biose $C_{12}H_{22}O_9$, die Digilanidobiose, die sich aus je 1 Mol Digitoxose und Glucose zusammensetzt.

Durch vorsichtiges Abspalten der Essigsäure entsteht aus dem Digilanid B das Desacetyl-digilanid B[15]), das mit dem schon beschriebenen Purpureaglycosid B aus Digitalis purpurea identisch ist.

Wird das Digilanid B der Einwirkung des Enzyms Digilanidase ausgesetzt, die in der frischen oder sorgfältig getrockneten Lanata-Blattsubstanz enthalten ist, so wird 1 Mol Glucose abgespalten und es kommt zur Bildung des Acetyl-gitoxins, das in den optisch isomeren α- und β-Formen auftritt. Der Acetylrest haftet also nicht an der endständigen Glucose. Das für die Enzymwirkung optimale p_H liegt bei 6,5—7, d. h. bei schwach saurer bis neutraler Reaktion. Die Enzyme Digipurpidase und Digilanidase scheinen verschieden und ihrem spezifischen Substrat angepaßt zu sein. Digilanidase ist für die Glucose-Abspaltung aus den acetylhaltigen Digilaniden geeigneter, während Digipurpidase die acetylfreien Purpureaglycoside rascher zu spalten vermag (Stoll). Die Digilanidobiose wird von den Enzymen beider Pflanzenarten nicht gespalten.

In den Digitalisblättern soll nach Cloetta[21]) noch das sog. Gitalin vorkommen, das bei der Hydrolyse ein neues Aglucon, das Gitaligenin, liefern soll. Beide Stoffe, Glycosid und Genin, konnten aber bisher nicht einwandfrei charakterisiert werden. Beim Gitaligenin handelt es sich wahrscheinlich um ein Hydrat des Gitoxigenins[22]). Das Gitaligenin spaltet unter den verschiedensten Bedingungen leicht Wasser ab und geht in Derivate des Gitoxigenins über.

Oleandrin

Nerium Oleander, zu der Familie der Apocynaceen gehörig, ist eine Pflanze, deren giftige Eigenschaften schon im Altertum bekannt waren. Von der Fa. C. F. Boehringer[16]) konnte aus den Blättern des Oleanders ein kristallisierter Stoff isoliert werden, der als Oleandrin bezeichnet wird und der eine digitalisähnliche Wirkung auf das Herz besitzt. Das Oleandrin ist fast unlöslich in Wasser, löslich in Chloroform und Alkohol und kristallisiert aus 50%igem Alkohol in Nadeln, die bei 249° schmelzen.

[15]) Stoll u. Kreis, Helv. Ch. A. 18, 120 (1935).
[21]) Arch. exp. Path. u. Pharm. 88, 113 (1920); 112, 261 (1926).
[22]) Windaus, Nachr. Ges. Wiss. Gött. 1928.
[16]) C. F. Boehringer u. Söhne, Mannheim-Waldhof.

Tabelle der Gitoxigenin-glycoside. Tab. I

Digilanid B
$C_{49}H_{76}O_{20}$

Enzymatische Abspaltung von
1 Mol Glucose mittels Digilanidase

Acetyl-gitoxin
$C_{43}H_{66}O_{15}$

↘ Abspaltung von 1 Mol Essigsäure mittels $Ca(OH)_2$

3 Digitoxo

paltung, + 5 H

E

Absp

M

H)

Purpureaglycosid B,
Desacetyl-Digilanid B
$C_{47}H_{74}O_{19}$

↘ Enzymatische Abspaltung von 1 Mol Glucose mittels Digipurpidase

Gitoxigenin
$C_{23}H_{34}O_5$

Säurespaltung, + 3 H_2O
— 3 Digitoxose $C_6H_{12}O_4$

Gitoxin
$C_{41}H_{64}O_{14}$

— 2 H_2O

Dianhydro-gitoxigenin, ←
Digitaligenin
$C_{23}H_{30}O_3$

Säurespaltung, + 2 H_2O
— 1 Digitalose, — 1 Glucose,
— 2 H_2O

Digitalin
$C_{36}H_{56}O_{14}$

+ H_2

Säure-
spaltung,
+ 1 H_2O

— 1 Digitalose $C_7H_{14}O_5$
— 2 H_2O

Dihydro-digitalin
$C_{36}H_{58}O_{14}$

Essigsäure-
anhydrid

Oleandrin
$C_{30}H_{46}O_9$

Hexa-acetyl-
digitalin

Tab. II

Tabelle einiger Gitoxigenin- und Digitaligenin-derivate.

Gitoxigenin, $C_{23}H_{34}O_5$
2 sek. u. 1 tert. OH, 1 |=, 1 Lactongr.

$+ H_2$ — $- 2 H_2O$ →

Dihydro-gitoxigenin, $C_{23}H_{36}O_5$
2 sek. u. 1 tert. OH, 1 Lactongr.

Dianhydro-gitoxigenin,
Digitaligenin, $C_{23}H_{30}O_3$
1 sek. OH, 3 |=, 1 Lactongr.

$- 2 H_2O$

Dianhydro-dihydro-gitoxigenin,
$C_{23}H_{32}O_3$, 1 sek. OH, 2 |=, 1 Lactongr.

$+ 2 H_2$

$+ 3 H_2$

$+ 2 H_2$

isom. Hexahydro-digitaligenin,
$C_{23}H_{36}O_3$, 1 sek. OH, 1 Lactongr.

Hexahydro-dianhydro-gitoxigenin,
Hexahydro-digitaligenin,
Tetrahydro-dianhydro-dihydro-gitoxigenin,
$C_{23}H_{36}O_3$, 1 sek. OH, 1 Lactongr.

CrO_3

CrO_3

isom. Lacton-dicarbonsäure,
$C_{23}H_{34}O_6$, 2 COOH, 1 Lactongr.

Hexahydro-dianhydro-gitoxigenon,
Hexahydro-digitaligenon,
Tetrahydro-dianhydro-dihydro-gitoxigenon,
$C_{23}H_{34}O_3$, 1 CO, 1 Lactongr.

$- H_2O$

$- CO_2$

Brenzketon $C_{22}H_{32}O_3$,
1 CO, 1 Lactongr.

Clemmensen-reduktion ↙ ↘ CrO_3

Lacton $C_{23}H_{36}O_2$,
1 Lactongr.

Lacton-dicarbonsäure,
$C_{23}H_{34}O_6$, 2 COOH, 1 Lactongr.

Bei der energischen sauren Hydrolyse liefert Oleandrin, wie Windaus und Westphal[17]) gefunden haben, Dianhydro-gitoxigenin, das wiederum als sekundäres Spaltprodukt aufzufassen ist. Die Zuckerkomponente, die nicht in kristallisiertem Zustande gefaßt wurde, ist wahrscheinlich identisch mit Digitalose. Oleandrin und Digitalin unterscheiden sich vermutlich nur dadurch, daß ersteres Digitalose, das letztere außerdem noch Glucose an Gitoxigenin gebunden enthält.

C II b. Digitoxigenin-glycoside: Digitoxin, Purpureaglycosid A, Digilanid A und Acetyl-digitoxin

Digitoxin[18])

Aus den Digitalisblättern erhält man nach den üblichen Methoden neben dem Gitoxin noch ein zweites Herzgift, das Digitoxin (Nativelles „Digitaline crystallisée"); dieses Glycosid ist ebenfalls in Wasser fast unlöslich, aber im Gegensatz zum Gitoxin in Chloroform und Alkohol leicht löslich. Es ist sehr schwierig, das Digitoxin vollkommen frei von Begleitstoffen zu erhalten. Die von Schmiedeberg und Kiliani untersuchten Präparate enthielten wahrscheinlich unter anderem noch Gitoxin. Die Anwesenheit von Gitoxin läßt sich durch die Violettfärbung mit Kilianis Reagens erkennen (konz. Schwefelsäure und wenig Ferrisalz). Reines Digitoxin muß sich (nach Kraft) bei dieser Reaktion rein braun färben.

Kiliani hat gefunden, daß das Digitoxin durch Säuren in Digitoxigenin und Digitoxose gespalten wird. Im Digitoxin müssen mindestens zwei Digitoxosemoleküle disaccharidartig miteinander verknüpft sein, denn dem Digitoxigenin stehen nur 2 Hydroxylgruppen zur Bindung von 3 Mol Digitoxose zur Verfügung.

Darst. des Digitoxins[19])[20]). Die mit Wasser erschöpften Digitalisblätter werden mit 50proz. Alkohol digeriert, der Extrakt mit basischem Bleiacetat gefällt und die filtrierte Lösung im Vakuum eingeengt. Die konzentrierte Lösung wird mehrfach mit Äther ausgeschüttelt und die Auszüge mit Wasser gewaschen. Aus der Ätherlösung setzen sich dann rasch grünweiße Krusten ab, die zunächst aus 85proz. Alkohol umkristallisiert wer-

[17]) Windaus u. Westphal, Nachr. Ges. Wiss. Gött. 1925.

[18]) Schmiedeberg, Arch. Pharm. 3, 16 (1874), 16, 162 (1883); Kiliani, Literaturzusammenstellung: B. 51, 1613, Anm. 1 (1918); Kraft, Arch. Pharm. 250, 118 (1912); Cloetta, Arch. exp. Path. Pharm. 88, 115 (1920), s. auch 112, 327 (1926); Windaus u. Freese, B. 58, 2503 (1925); Windaus u. Stein, B. 61, 2436 (1928).

[19]) Kiliani, Arch. exp. Path. Pharm. 233, 311 (1895).

[20]) Windaus u. Freese, B. 58, 2503 (1925).

den. Dieses Rohprodukt wird mit Chloroform digeriert, der ungelöste Anteil (Gitoxin) abfiltriert und der lösliche Anteil (Digitoxin) aus verd. Alkohol umkristallisiert. Dann wird das Digitoxin aus seiner Chloroform-Lösung mittels Äther ausgefällt (noch in Chloroform unlösliche Anteile werden abgetrennt), und mehrmals aus sd. Essigester, verd. Alkohol oder Chloroform-Äther umkristallisiert. Perlmutterglänzende Tafeln, Schmp. 255—257° $[\alpha]_D = +4{,}81°$ (Dioxan). 1 g Digitoxin löst sich bei 10° in 10,8 g Chloroform und bei 20° in 380 g Essigester.

Digitoxigenin (I). Aus Gitoxin durch Hydrolyse mit alkoh. HCl in der Kälte. Prismen, Schmp. 250°; $[\alpha]_D = +19{,}1°$ (Methanol). Acetat, Nadeln vom Schmp. 217°.

Anhydro-digitoxigenin (II). Aus I durch Einwirkung von alkoholischem HCl in der Wärme, Schmp. 193°; $[\alpha]_D = -4{,}7°$ (Methanol).

Tetrahydro-anhydro-digitoxigenin (III). Aus II durch Hydrierung mit Pd u. H_2. Nadeln aus Essigester-Petroläther oder verd. Methanol, Schmp. 167—168°; $[\alpha]_D = +24{,}6°$ (Methanol).

Tetrahydro-anhydro-digitoxigenon (IV). Aus III durch Chromsäureoxydation in Eisessig in der Kälte. Umkristallisiert aus Methanol, dann aus Essigester. Blättchen vom Schmp. 245°; $[\alpha]_D = +37{,}3°$ (Chloroform).

Lacton $C_{23}H_{36}O_2$ (V). Aus IV durch Clemmensen-Reduktion, Blättchen aus verd. Methanol, Schmp. 185°; $[\alpha]_D = +33{,}7°$ (Chloroform).

Lacton-dicarbonsäure (VI). Aus IV durch Chromsäureoxydation in Eisessig in der Wärme. Nadeln aus Aceton, Schmp. 296°. Dimethylester, Blättchen vom Schmp. 128°.

Purpureaglycosid A

Gleichzeitig mit der Isolierung des schon beschriebenen Purpureaglycosids B wurde aus den Digitalisblättern von Stoll das Purpureaglycosid A[12]) isoliert. Dieses letztere liefert bei der totalen Hydrolyse Digitoxigenin, Digitoxose und Glucose. Auch beim Purpureaglycosid A gelang es den Glucoserest durch Enzymwirkung abzuspalten und damit die enzymatische Bildung des Digitoxins zu beweisen.

Das bereits erwähnte Digilanid A[13]) unterscheidet sich vom Purpureaglycosid A (Desacetyl-digilanid A) nur durch den Mehrgehalt einer Acetylgruppe. Die genuinen Herzglycoside aus Digitalis purpurea und Digitalis lanata sind also in ihrem Aufbau außerordentlich ähnlich.

Über die Bildung des Acetyl-digitoxins siehe Tabelle III.

Die Darst. der Purpureaglycoside erfolgt im wesentlichen nach der gleichen Methode, wie sie für die Darst. der Lanataglycoside angegeben ist (s. S. 189). Die Trennung der beiden Purpureaglycoside gelingt erst durch mühselige Fraktionierung des Gemisches unter Ausnutzung des verschiedenen Verteilungsverhältnisses der einzelnen Bestandteile zwischen Chloroform und wäßrigem Methanol. Die beiden Glycoside A u. B sind nicht kristallisiert, sie bilden amorphe weiße Pulver und werden durch Umfällen aus Methanol-Wasser, bei Gegenwart von schwachem Alkali, gereinigt. Pur-

Tab. III

Tabelle der Digitoxigenin-glycoside und einiger Derivate des Digitoxigenins

Digilanid A
$C_{49}H_{76}O_{19}$

Enzymatische Abspaltung von 1 Mol Glucose mittels Digilanidase →

Acetyl-digitoxin
$C_{43}H_{66}O_{1}$

Abspaltung von 1 Mol Essigsäure mittels $Ca(OH)_2$ →

Purpureaglycosid A,
Desacetyl-digilanid A
$C_{47}H_{74}O_{18}$

Enzymatische Abspaltung von 1 Mol Glucose mittels Digipurpidase →

Digitoxo

Säurespa ig, + 5 H_2O

Gluco

Es g äu

M

Digitoxigenin
$C_{23}H_{34}O_4$
1 sek. u. 1 tert. OH,
1 ⊨, 1 Lactongr.

Säurespaltung, + 3 H_2O
· 3 Digitoxose, $C_6H_{12}O_4$

Digitoxin
$C_{41}H_{64}O_{13}$

— H_2O

Anhydro-digitoxigenin,
$C_{23}H_{32}O_3$, 1 sek. OH,
2 ⊨, 1 Lactongr.

+ 2 H_2 →

Tetrahydro-anhydro-digitoxigenin,
$C_{23}H_{36}O_3$, 1 sek. OH, 1 Lactongr.
(isomer mit Hexahydro-dianhydro-gitoxigenin)

CrO_3 ↙

Tetrahydro-anhydro-digitoxigenon,
$C_{23}H_{34}O_3$, 1 CO, 1 Lactongr.

↙ Clemm.-Red.

CrO_3 ↘

Lacton $C_{23}H_{36}O_2$, 1 Lactongr.,
(isomer mit Lacton $C_{23}H_{36}O_2$
aus Gitoxigenin)

Lacton-dicarbonsäure,
$C_{23}H_{34}O_6$, 2 COOH, 1 Lactongr.

pureaglycosid A, Zers. 270° (korr.); $[\alpha]_D = +12{,}1°$ (75proz. Alkohol). Purpureaglycosid B, Zers. 238—240° (korr.), Sintern bei 225—230°; $[\alpha]_D = +20{,}4°$ (75proz. Alkohol).

C II c. Digoxigenin-glycoside: Digoxin, Digilanid C, Desacetyl-digilanid C und Acetyl-digoxin

Digoxin

Aus den Blättern von Digitalis lanata konnte Smith[24]) ein neues Herzgift isolieren, das er als Digoxin bezeichnet hat. Bei der Hydrolyse dieses Glycosids erhält man das Digoxigenin. Digoxigenin ist mit Gitoxigenin isomer und ist diesem auch in seinem chemischen Verhalten außerordentlich ähnlich, so daß man vermuten kann, daß beide Genine das gleiche Kohlenstoffskelett besitzen und sich nur durch die Stellung einer oder mehrerer Hydroxylgruppen unterscheiden; doch steht der Beweis noch aus.

Digoxin. Platten aus verd. Alkohol oder Pyridin-Wasser, Zers. 265°; $[\alpha]_{5461} = +13{,}3°$ (Pyridin); fast unlöslich in Chloroform, Essigester, Aceton, löslich in einer Mischung von Chloroform und Alkohol.

Digoxigenin (I). Aus Digoxin durch Einwirkung von alkohol. HCl, Prismen aus Essigester, Schmp. 222°; $[\alpha]_{5461} = +27{,}0°$ (Methanol). Diacetat, Prismen aus verd. Alkohol, Schmp. 221°; $[\alpha]_{5461} = +61{,}3°$ (Methanol).

Anhydro-digoxigenin. Aus I durch Kochen mit 5proz. wäss.-alkoh. H_2SO_4, Prismen aus Essigester, Schmp. 182°; $[\alpha]_{5461} = +16{,}3°$ (Methanol). Diacetat, Schmp. 199°.

Iso-digoxigenin. Aus I durch Behandeln mit alkoh. KOH, Prismen aus Essigester, Nadeln aus verd. Alkohol, Schmp. 260° (Zers.); $[\alpha]_{5461} = +13{,}6°$. Diacetat, Nadeln aus verd. Alkohol, Schmp. 280°.

Iso-digoxigensäure. Aus I durch Oxydation in alkalischer Lösung mit Hypobromit, Schmp. 228°.

Digilanid C

Das gleichfalls aus Lanata-Blättern isolierte Digilanid C unterscheidet sich vom Digoxin nur durch den Mehrgehalt von je 1 Mol Glucose und Essigsäure.

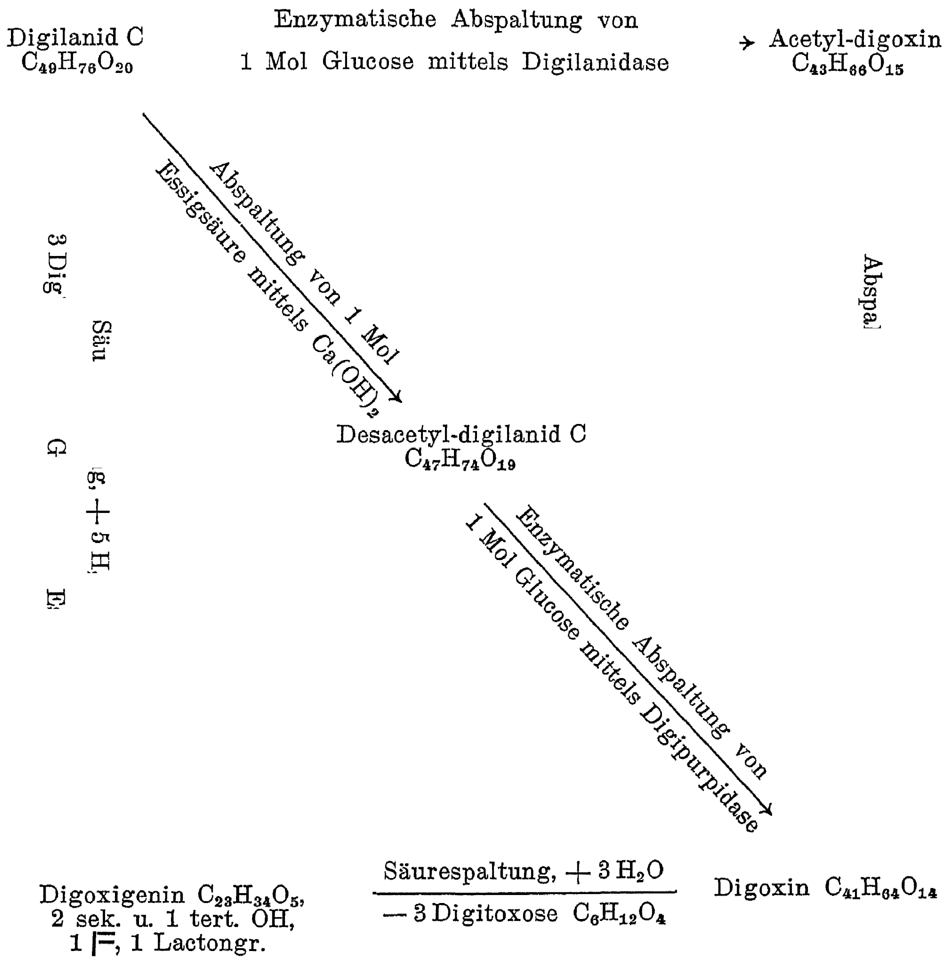
Das Desacetyl-digilanid C (siehe Tab. IV) ist im Gegensatz zu den Desacetyl-glycosiden A und B kristallisiert. Ein Unterschied in der physiologischen Wirksamkeit besteht zwischen den Digilaniden und ihren Desacetyl-produkten nicht, wie aus folgender Tabelle hervorgeht.

[24]) Soc. 1930, 508, 2478.

Letale Dosen pro Kilogramm Katze:

	Digilanide	Desacetyl-digilanide
A	0,368 mg	0,337 mg
B	0,346 mg	0,369 mg
C	0,255 mg	0,228 mg

Tabelle der Digoxigenin-glycoside. Tab. IV.



Darst. des Digilanids[13]). Frische Lanata-Blätter werden mit Ammoniumsulfat zu einem Brei zerstampft und der Brei hydraulisch abgepreßt. Der Preßsaft enthält nur geringe, zu vernachlässigende Glycosidmengen. Der feste Preßkuchen wird dann mit Essigester mehrere Stunden durchgerührt, wobei die Glycoside in Lösung gehen. Nach Absaugen wird die Essigesterlösung i. V. bei höchstens 35° vollständig eingedampft. Der Rückstand wird zunächst mit Äther digeriert, wobei nur Begleitstoffe in

Lösung gehen. Das in Äther unlösl. gelbgrüne Pulver (Lanata-Reintannoid) wird mittels Bleihydroxyd von Gerbstoffen befreit. Beim Einengen der methanol. Lösung im Vakuum bei tiefer Temperatur scheidet sich der größte Teil des Digilanids aus; lange dünne Prismen aus Methanol 245—248° (Zers.); $[\alpha]_D = +24{,}4°$ (Dioxan), $[\alpha]_D = +33{,}3°$ (Alkohol); 1 g lösen sich bei Zimmertemperatur in 15—20 ccm Methanol oder 10 l Wasser.

Die präparative Trennung des Digilanids in seine 3 Komponenten kann man durch Ausnutzung des verschiedenen Verteilungsverhältnisses der Bestandteile zwischen methanol-haltigem Wasser und Chloroform erreichen. Das Gesamt-digilanid enthält die 3 Komponenten etwa in folgendem Verhältnis: 46% A, 17% B, 37% C.

Die Toxicität des Digilanids beträgt 0,34 mg/kg bei der Katze und 400 F.—D. per 1 mg beim Frosch.

Digilanid A, Zers. 245—248°, $[\alpha]_D = +31{,}4°$ (Alkohol).
„ B, „ 245—248°, $[\alpha]_D = +36{,}7°$ „
„ C, „ 245—248°, $[\alpha]_D = +33{,}5°$ „

Die 3 Aglucone lassen sich durch folgende Ausführung der Keller-Kilianischen Reaktion unterscheiden: Eine Lösung von 1 mg Substanz in 5 ccm Essigester wird unter Zusatz von 1 Tropfen 20proz. Ferrichloridlösung mit 5 ccm H_2SO_4 unterschichtet und dann gut durchgeschüttelt,

Digitoxigenin färbt die Lösung grasgrün
Gitoxigenin „ „ „ tiefrot,
Digoxigenin „ „ „ goldgelb bis goldbraun.

Enzymatische Glycosid-Spaltung. Zur Bereitung des Enzympräparates werden frische Purpurea-Blätter mit A. und zweimal mit 50proz. A. extrahiert, wonach das Blattmaterial praktisch glycosidfrei geworden ist. Der so vorbereitete Preßkuchen wird in eine Lösung von Desacetyldigilanid A in 50proz. Alkohol eingetragen. Nach 3½tägigem Rühren bei Zimmertemperatur wird filtriert. Aus dem Filtrat läßt sich das gebildete Digitoxin mit Chloroform ausschütteln.

C II d. Herzgiftglycoside, die als Genin-Komponente Strophanthidin enthalten: Cymarin aus Apocynum cannabinum und die Strophanthusglycoside k-Strophanthin (K-Strophanthin-β), h-Strophanthin und e-Strophanthin

Cymarin. Das Cymarin ist der wirksame Bestandteil aus der Wurzel und aus der Rinde von Apocynum cannabinum, einer Pflanze, die den Strophanthusarten botanisch am nächsten steht. Auch in anderen Apocyneen, wie Apocynum androsemifolium und Apocynum venetum findet man als wirksames Prinzip das Cymarin. Husemann[26]) und Schmiedeberg[27]) sowie Finnemore[28]) und Moore[29]) haben

[26]) Arch. Pharm. 5, 245 (1876).
[27]) Arch. Pharm. 16, 161 (1883).
[28]) P. Ch. S. 25, 77 (1909).
[29]) Soc. 95, 734 (1909).

sich mit der Isolierung des wirksamen Stoffes beschäftigt. Aber erst Taub und Fickewirth[30]) ist es gelungen, das Herzgift in reinem Zustande darzustellen. Windaus und Hermanns[31]) haben sich dann mit der chemischen Untersuchung des Cymarins befaßt.

Das Cymarin gibt die typische Farbreaktion der Herzgifte, den Legaltest. Es besitzt die Formel $C_{30}H_{44}O_9$ und wird durch Behandeln mit verdünnter Salzsäure in Cymarigenin und Cymarose zerlegt. Windaus und Hermanns[32]) fanden weiterhin, daß das Cymarigenin in allen Einzelheiten mit Strophanthidin identisch ist. Das Strophanthidin war schon von Feist[33]) bei der Hydrolyse von Strophanthin kombé erhalten worden. Für die Spaltung des Cymarins mit Säuren gilt daher folgende Gleichung:

$$\underset{\text{Cymarin}}{C_{30}H_{44}O_9} + H_2O = \underset{\substack{\text{Strophanthidin}\\ \text{(Cymarigenin)}}}{C_{23}H_{32}O_6} + \underset{\text{Cymarose}}{C_7H_{14}O_4}$$

Die Zuckerkomponente ist wahrscheinlich der Methyläther der Digitoxose. Wenn man das Cymarin mit Alkalien erwärmt, tritt keine Spaltung ein, nur der Lactonring wird geöffnet. Als Reaktionsprodukt erhält man die Cymarinsäure: $C_{30}H_{44}O_9 + H_2O = C_{30}H_{46}O_{10}$. Die gebildete Oxysäure scheint keine Neigung zu besitzen, in ein Lacton überzugehen und ist physiologisch völlig unwirksam. Wird sie mit Säuren behandelt, liefert sie neben Cymarose nicht Strophanthidin sondern Iso-Strophanthidin.

Strophanthidin $C_{23}H_{32}O_6$: Von den 6 Sauerstoffatomen des Strophanthidins gehören zwei einer Lactongruppe an. Strophanthidin ist einfach ungesättigt. Weiterhin sind drei Hydroxylgruppen vorhanden, von denen eine acetylierbar ist und zu Carbonyl oxydiert werden kann; die beiden übrigen Hydroxyle sind tertiärer Natur. Das letzte Sauerstoffatom liegt in Gestalt einer Aldehydgruppe vor, die man durch Oximbildung nachweisen kann. In gewissen Derivaten des Strophanthidins läßt sich die Aldehydgruppe einerseits zur Carboxylgruppe oxydieren und andererseits zur Methylgruppe reduzieren. Bei der alkalischen Verseifung liefert Strophanthidin eine Säure, die leicht unter Wasserabspaltung in das neutrale Iso-Strophanthidin übergeht.

Cymarin. Das Cymarin wird aus den Wurzeln von Apocynum cannabinum nach den üblichen Methoden isoliert. Farblose Prismen aus wäß-

30) C. 1913 I, 477.
31) B. 48, 979 (1915).
32) B. 48, 991 (1915).
33) Feist, B. 31, 534 (1898); B. 33, 2069 (1900).

rigem Methanol, Zers. zwischen 130 und 138°; $[\alpha]_D = + 35{,}0°$ (Chloroform); leicht löslich in Alkohol, Chloroform, Essigester, schwer löslich in Wasser und Äther, unlöslich in Petroläther.

Cymarinsäure: Aus Cymarin durch alkalische Verseifung, farblose Prismen aus Aceton-Wasser oder Essigester-Petroläther vom Schmp. 168°.

Strophanthidin (Cymarigenin): Cymarin wird in alkoholischer Lösung in der Kälte mit verd. Salzsäure behandelt.

Das Strophanthidin ist leicht löslich in Alkohol, Aceton und Eisessig, fast unlöslich in Wasser, Äther und Petroläther. Es kristallisiert aus 5 Teilen Methanol und 10 Teilen Wasser in derben, perlmutterglänzenden rhombischen Tafeln, Zers. um 171°; $[\alpha]_D = + 44°$ (Methanol). Mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure gibt Strophanthidin die Liebermannsche Farbreaktion wie Cholesterin; es reduziert schwach ammoniakalische Silberlösung. Pharmakologisch ist es noch wirksam.

Monobenzoat dünne Blättchen aus verd. Methanol, Schmp. 230°; $[\alpha]_D = + 47{,}8°$ (Aceton).

Strophanthidin-p-brombenzoat aus Eisessig-Wasser, Schmp. 222—224°.

Strophanthidin-phenylhydrazon, aus Alkohol, Schmp. 230 bis 232°.

Dihydro-Strophanthidin, durch Hydrierung von Strophanthidin mit Palladium und Wasserstoff; rhombische Prismen (Dihydrat) aus 50proz. Alkohol; die wasserfreie Substanz schmilzt bei 190—195°.

Iso-strophanthidin (Strophanthidinsäure-lacton von Feist, Isocymarigenin von Windaus und Hermanns): Aus Strophanthidin durch Isomerisierung mit methylalkohol. KOH bei Zimmertemperatur, glänzende Schuppen aus 50proz. Alkohol, Schmp. 255—257°; unwirksam.

k-Strophanthin (K-Strophanthin-β)

In den Samen von Strophanthus kombé ist ein Gemisch von verschiedenen Glycosiden vorhanden, die sämtlich bei der Hydrolyse Strophanthidin liefern. Neben dem sog. amorphen k-Strophanthin findet man in den alkoholischen Extrakten in geringer Menge ein kristallisiertes Strophanthinglycosid. Jacobs und Hoffmann[34]) konnten das kristallisierte k-Strophanthin auf folgende Weise in mehrere Komponenten zerlegen: In trocknem Zustande ist der Stoff in Chloroform nur spärlich löslich und bildet mit diesem Lösungsmittel eine breiige Masse. Wenn man aber zu diesem Brei Wasser hinzugibt und die Mischung längere Zeit schüttelt, löst sich die Masse auf. Durch diese Operation kann man das kristallisierte Glycosid in einen wasserlöslichen und einen chloroformlöslichen Anteil trennen.

Aus dem Chloroformextrakt läßt sich leicht Cymarin isolieren. Die in Wasser lösliche Fraktion scheidet beim Einengen Kristalle eines

[34]) J. biol. Chem. 69, 153 (1926); J. biol. Chem. 67, 609 (1926).

neuen Glycosides ab, das von Jacobs als K-Strophanthin-β bezeichnet worden ist und die Formel $C_{36}H_{54}O_{14}$ besitzt. Es ist fraglich, ob das kristallisierte k-Strophanthin ein Gemisch konstanter Zusammensetzung darstellt. Bei der Hydrolyse zerfällt das K-Strophanthin-β in Strophanthidin und eine Biose $C_{13}H_{24}O_9$ nach folgender Gleichung:

$$\underset{\text{K-Strophanthin-}\beta}{C_{36}H_{54}O_{14}} + H_2O = \underset{\text{Strophanthidin}}{C_{23}H_{32}O_6} + \underset{\text{Strophanthobiose}}{C_{13}H_{24}O_9}$$

Die Natur dieser Biose wurde indirekt durch enzymatische Spaltung ermittelt. In den Samen von Strophanthus courmonti ist ein Enzym, die sog. Strophanthobiase, vorhanden. Dieses Enzym hat die Fähigkeit, in gewissen Strophanthus-polyglycosiden, an deren Aufbau eine Biose aus Glucose und einem α-Desoxyzucker beteiligt ist, die Bindung zwischen diesen beiden Monosen zu spalten, ohne dabei die Bindung zwischen dem Aglucon und dem hiermit direkt verbundenen Zucker anzugreifen. Durch Einwirkung von Strophanthobiase wird K-Strophanthin-β in Cymarin und Glucose gespalten.

$$\underset{\text{K-Strophanthin-}\beta}{C_{36}H_{54}O_{14}} \xrightarrow{\text{Enzymspaltung}} \underset{\text{Cymarin}}{C_{30}H_{44}O_9} + \underset{\text{Glucose}}{C_6H_{12}O_6}$$

Die beiden Herzgifte K-Strophanthin-β und Cymarin enthalten also dasselbe zuckerfreie Spaltstück, das Strophanthidin. Sie unterscheiden sich nur dadurch, daß das erstere mit Strophanthobiose, das letztere mit Cymarose als Zuckerpaarling gekuppelt ist.

Die Strophanthobiose setzt sich also aus Cymarose und Glucose zusammen; die freie Biose kann nicht ohne Zersetzung in ihre Komponenten zerlegt werden.

Der größere Teil des Strophanthins aus Kombé-Samen besteht aus dem sog. „amorphen k-Strophanthin“. Aus den analytischen Daten von gereinigtem „amorphen k-Strophanthin“ geht hervor, daß die in diesem Gemisch vorherrschende Substanz ein Strophanthin-Triglycosid ist, das eine Kette von 2 Glucosemolekülen an Cymarose gebunden enthält. Wahrscheinlich sind in diesem Gemisch noch mehr komplexe Strophanthin-polyglycoside vorhanden, die eine Kette von drei oder mehr Glucosemolekülen an Cymarin gebunden enthalten. Das Gemisch dieser wasserlöslichen Glycoside wird ebenfalls durch Enzyme in Cymarin und Glucose gespalten.

Das Strophanthin aus Strophanthus kombé-Samen ist also sehr komplexer Natur. Es besteht in der Hauptsache aus amorphen Cymarin-polyglycosiden; in geringerer Menge sind zwei kristallisierte Glycoside

vorhanden, das Cymarin und das K-Strophanthin-β, die die beiden einzigen bisher bekannten einheitlichen und gut charakterisierten Strophanthidin-glycoside darstellen.

Monoacetyl-cymarin, seidige Nadeln aus verd. Methanol, Schmp. 160—161°.

Kristallisiertes k-Strophanthin, Nadeln aus Alkohol-Wasser, Schmp. 180—183°, $[\alpha]_D = +30{,}5°$ (Alkohol).

K-Strophanthin-β, Umkrist. durch Eindampfen seiner alkoholisch-wäßrigen Lösung, Schmp. 187°, $[\alpha]_D = +32{,}6°$ (Wasser).

K-Strophanthin-β-tetraacetat, dünne Nadeln aus verd. Alkohol, Schmp. 167°.

h-Strophanthin[25]). Zu den Herzgiften, die bei der Hydrolyse Strophanthidin liefern, gehören auch die wirksamen Bestandteile aus den Samen von Strophanthus hispidus. Schon Heffter und Sachs[35]), Brauns und Closson[36]) haben aus Hispidus-Strophanthin bei der Hydrolyse Strophanthidin erhalten. Hispidus-Strophanthin ist (ebenso wie Kombé-Strophanthin) kein einheitlicher Stoff, sondern ein Glycosidgemisch; in diesem Gemisch kommt Cymarin sowohl frei als auch an Glucose gebunden vor. In beiden Strophanthusglycosiden scheint aber die Bindung zwischen Cymarin und Glucose verschieden zu sein, denn sie unterscheiden sich in charakteristischer Weise in ihrem Verhalten gegenüber dem Enzym Strophanthobiase aus Strophanthus courmonti-Samen. Während das Kombé-Strophanthin durch dieses Enzym glatt in Cymarin und Glucose zerlegt werden kann, wird das Strophanthin aus Strophanthus hispidus nicht im mindesten angegriffen. Dagegen die speziellen Enzyme aus Strophanthus-hispidus-Samen vermögen, wenn auch nur langsam und unvollständig, h-Strophanthin in Cymarin und Glucose zu spalten. Hispidus-Strophanthin ist also chemisch verschieden von Kombé-Strophanthin, obwohl beide Glycoside als Hauptbestandteil Cymarin enthalten.

Die Abspaltung endständiger Glucose aus glucosehaltigen Herzgiften durch bestimmte Enzyme ist bei diesen Glycosiden ein verbreiteter Vorgang (vgl. Purpureaglucoside und Digilanide, S. 181). In den angeführten Fällen wird die Bindung zwischen Glucose und einem α-Desoxyzucker durch Enzyme sehr leicht gelöst, während die Bindung zwischen Genin und Desoxyzucker nicht angegriffen wird.

Bei der Hydrolyse vermittels Säuren wird dagegen die Bindung zwi-

[25]) Jacobs und Hoffmann, J. biol. Chem. 79, 531 (1928).
[35]) Bio. Z. 40, 83 (1912).
[36]) J. Am. Pharmaceut. Ass. 2, 489, 604, 715 (1913).

schen dem Aglucon und dem gesamten Zuckerrest gesprengt, während die Biose nur sehr schwer gespalten wird. Bei der sauren Hydrolyse tritt eine Regelmäßigkeit besonders in Erscheinung: Während z. B. Digitoxin, Gitoxin, Digoxin, K-Strophanthin-β und Cymarin sehr leicht hydrolysierbar sind, erweisen sich Digitalinum verum, Oleandrin und Antiarin unter denselben Bedingungen als sehr widerstandsfähig; die ersteren enthalten als Zuckerkomponenten α-Desosen, die zweiten nicht. Schon M. Bergmann und Mitarbeiter[37]) hatten beobachtet, daß die Glycosid-Bildung und ebenso die Glycosid-Spaltung bei den α-Desosen besonders leicht und glatt vor sich geht.

Neben dieser enzymatischen Zuckerspaltung wurde von Jacobs[38]) noch eine andere Enzymreaktion beobachtet. In den Strophanthus-Samen kommt neben Strophanthobiase noch ein anderes Enzym vor, unter dessen Einwirkung das Cymarin in das isomere Allo-cymarin umgelagert wird. Die Isomerisierung findet im Aglucon statt, denn bei der Hydrolyse erhält man Cymarose, dagegen kein Strophanthidin, sondern Allo-Strophanthidin. Dieses hat ebenfalls die Zusammensetzung $C_{23}H_{32}O_6$ und die Funktionen der Sauerstoffatome sind dieselben wie beim Strophanthidin. Es gibt auch noch einen positiven Legal-Test. Die Isomerisierung durch das Enzym scheint also rein stereochemischen Charakters zu sein; interessanterweise wird die typische Herzwirkung des Cymarins durch die enzymatische Umlagerung vollständig zerstört. Während 0,015 mg Cymarin genügen, um einen Frosch zu töten, waren 2 mg bzw. 4 mg Allo-Cymarin ohne jede Wirkung auf einen 35 g bzw. 25 g schweren Frosch. Die Umlagerung zum Allo-strophanthidin findet bei der Eigenspaltung gemahlener und entfetteter Samen unabhängig und gleichzeitig mit der Zuckerspaltung statt. Wenn man die Spaltung sich fortsetzen läßt, ist die Allo-Verbindung das Hauptprodukt. Während Cymarin einen äußerst bitteren Geschmack besitzt, ist Allo-Cymarin praktisch geschmacklos.

Allo-cymarin, dünne Blättchen aus verd. Alkohol, Schmp. 145—150° (Zers.), $[\alpha]_D = +43°$ (Methanol), unlösl. in Wasser, leichtlösl. in Methanol. Allo-strophanthidin, Prismen aus Alkohol, Schmp. 248—250°, $[\alpha]_D = +37°$ (Alkohol); in einigen Fällen wurden Schmp. bis 274° hinauf beobachtet.

e-Strophanthin[39]). Die Samen von Strophanthus eminii enthalten

[37]) B. 55, 169 (1922).

[38]) J. biol. Chem. 88, 519 (1930).

[39]) Jacobs u. Bigelow, J. biol. Chem. 99, 521 (1932—33).

ein Glycosidgemisch sehr komplexer Natur. Es besteht aus leicht spaltbaren und aus stabileren Glycosiden. Die Ersteren, die nicht in kristallisiertem Zustande erhalten wurden, sind Glycoside eines Desoxyzuckers. Bei der Hydrolyse liefern sie eine Aglucon-Fraktion, die aus einem Gemisch von Strophanthidin und Periplogenin besteht.

Aus dem Gemisch der stabileren Glycoside wurde ein chloroformlösliches Monosid $C_{30}H_{46}O_9$ und ein in Chloroform spärlich lösliches Biosid $C_{36}H_{56}O_{14}$ isoliert. Beide Glycoside erwiesen sich als Derivate desselben Aglucons $C_{23}H_{34}O_5$, das mit Periplogenin isomer ist. Das Aglucon konnte allerdings nicht als solches isoliert werden. Durch eine spezielle Methodik erhält man aus den beiden Glycosiden ein Trianhydro-Derivat $C_{23}H_{28}O_2$, das mit Trianhydro-periplogenin isomer ist.

Da die Toxicität beider Glycoside aber weit geringer ist als die des Periplocymarins (0,5 mg waren an einem 33 g schweren Frosch unwirksam), liegt der Verdacht nahe, daß das Monosid und das Biosid beim langen Lagern der Samen (3 Jahre) durch Enzymwirkung in Alloperiplogeninglycoside umgewandelt worden sind.

Die Aglucon-Fraktion läßt sich sehr schwer durch frakt. Krist. trennen. Strophanthidin und Periplogenin wurden auf folgende Weise nachgewiesen: Das Gemisch der Genine wird 15 Min. mit 5%ig. absol. methylalkohol. HCl im Rohr auf 100° erhitzt. Nach Umkristallisieren des Reaktionsproduktes erhält man das charakteristische Methylal vom Dianhydro-strophanthidin, Schmp. 242—244°, $[\alpha]_D = -124{,}7°$ (Chloroform). Zum Nachweis des Periplogenins wird das Aglucongemisch mit Pt u. H_2 hydriert, wobei ein Mol Wasserstoff aufgenommen wird. Das Reaktionsprodukt wird in einen in Äther löslichen und einen unlöslichen Anteil getrennt. Aus dem ätherlöslichen Anteil läßt sich das Dihydro-periplogenin isolieren, Schmp. 201—203°.

C II e. Sarmentocymarin. Ouabain. Periplocymarin. Uzarin

Sarmentocymarin. Aus den Samen von Strophanthus sarmentosus konnten Jacobs und Heidelberger[40]) ein neues Strophanthusglycosid, das Sarmentocymarin, darstellen, indem sie auf den wäßrigen, mit Chloroform extrahierten Extrakt ein aus Strophanthus-sarmentosus-Samen bereitetes Enzympräparat einwirken ließen. Nach 7tägigem Stehen bei 38° konnte das Sarmentocymarin mit Chloroform ausgeschüttelt werden. Der abgespaltene Zucker war identisch mit Glucose.

Das Sarmentocymarin hat die Formel $C_{30}H_{46}O_8$ und ist isomer mit Periplocymarin (s. S. 198). Durch Säuren wird Sarmentocymarin leicht gespalten und man erhält ein Aglucon von der Formel $C_{23}H_{34}O_5$, das Sarmentogenin:

[40]) J. biol. Chem. 81, 765 (1929).

$$\underset{\text{Sarmentocymarin}}{C_{30}H_{46}O_8} + H_2O = \underset{\text{Sarmentogenin}}{C_{23}H_{34}O_5} + \underset{\text{Sarmentose}}{C_7H_{14}O_4}$$

Der Aufbau der Zuckerkomponente, der Sarmentose, ist noch unbekannt. Sarmentogenin ist mit Periplogenin und Gitoxigenin isomer und besitzt mit diesen Geninen auch in chemischer Hinsicht eine große Ähnlichkeit. Von den vorhandenen drei Hydroxylgruppen lassen sich zwei benzoylieren; bei der Chromsäureoxydation entsteht aber nur ein Monoketon; ein Hydroxyl ist also sicher sekundärer Natur. Fernerhin ist eine Lactongruppe und eine Doppelbindung vorhanden. Bei der Behandlung mit Alkali erhält man das Iso-Sarmentogenin; dieses läßt sich in alkalischer Lösung mit Hypobromit zu der Iso-sarmentogensäure oxydieren. Sarmentogenin ist also ein einfach ungesättigtes Trioxy-lacton wie Periplogenin und Gitoxigenin. Man hat bisher noch kein Derivat vom Sarmentogenin darstellen können, das mit einem Derivat der gut untersuchten Herzgifte identisch ist.

Sarmentocymarin: Derbe Prismen, aus verd. Alkohol oder verd. Aceton (enthält 2 Mol Kristallwasser), Schmp. des Hydrats 130° unter Aufschäumen. In Wasser praktisch unlöslich, $[\alpha]_D = -12{,}5°$ (Hydrat in Methanol). Sarmentogenin $C_{23}H_{34}O_5$ (I): Durch saure Hydrolyse von Sarmentocymarin; Prismen aus 85proz. Alkohol, Schmp. 265—266°; Präparate, die Kristall-Lösungsmittel enthalten, schmelzen bei 243°; beträchtlich löslich in warmem Methyl- und Aethyl-alkohol, praktisch unlöslich in Benzin und Äther $[\alpha]_D = +21{,}5°$ (Alkohol).

Sarmentogenin-dibenzoat, flache Prismen aus verd. Aceton, Schmp. 281°.

Dihydro-sarmentogenin $C_{23}H_{36}O_5$: Aus I durch Hydrierung mit Platin und Wasserstoff, Schmp. 142°, aus Alkohol.

Sarmentogenon $C_{23}H_{32}O_5$: Durch Chromsäure-Oxydation von I, prismatische Nadeln aus verd. Alkohol, Schmp. 226°. Monosemicarbazon Schmp. 200°.

Iso-sarmentogenin $C_{23}H_{34}O_5$: Durch Behandeln von I mit Alkali, Nadeln aus Alkohol, Schmp. 248°.

Iso-sarmentogensäure $C_{23}H_{34}O_6$: Durch Oxydation von I in alkalischer Lösung mit Hypobromit, Platten aus verd. Alkohol, Schmp. 212°; Methylester, Schmp. 274°.

Oùabain. Eine weitere sehr wichtige Strophanthusart ist Strophanthus gratus. Die Samen enthalten, wie Arnaud[41]) gezeigt hat, in reichlicher Menge ein prächtig kristallisierendes Glycosid, das Oùabain, das er zuerst in den Wurzeln und in der Rinde des Oùabaio-Baumes aufgefunden hat. Dieses Glycosid ist wegen seiner hervorragenden physi-

[41]) Compt. rend. Acad. 107, 1011 (1888); 107, 1162 (1888); 126, 346, 1208, 1654, (1898).

kalischen Eigenschaften und wegen seiner Homogenität in großem Maße als Standard für die Prüfung von Digitalis- und Strophanthus-Präparaten verwendet worden. Jacobs und Bigelow[42]) haben für Oùabain und sein Aglucon die Formeln $C_{29}H_{44}O_{12}$ bzw. $C_{23}H_{34}O_8$ aufgestellt. Das Oùabain ist gegen Hydrolyse außerordentlich beständig. Die Spaltungsbedingungen müssen daher so energisch gehalten werden, daß das Aglucon bei seiner Bildung in harzige Zersetzungsprodukte übergeführt wird. Das Aglucon vom Oùabain kennt man also nicht.

Oùabain ist ein Rhamnoseglycosid (Arnaud) und gibt eine positive Legalsche Probe; es ist ein einfach ungesättigtes Lacton und das entsprechende Genin sollte ein einfach ungesättigtes Hexa-oxy-lacton sein.

Mit Hilfe einer besonderen Reaktion gelingt es, aus Oùabain ein kristallisiertes Spaltprodukt zu erhalten. Als Ausgangsmaterial dient das Anhydro-oùabain-heptaacetat, das Arnaud aus Oùabain durch Erhitzen mit Essigsäureanhydrid und Zinkchlorid erhalten hatte; es enthält eine Doppelbindung mehr als Oùabain. Beim Acetylieren ist anscheinend 1 Mol Wasser abgespalten worden. Durch Erhitzen des Tetrahydroproduktes dieses Acetats mit Eisessig-Salzsäure wird ein Produkt der Formel $C_{24}H_{30}O_4$ gebildet; dieses ist das Acetat eines Mono-oxy-lactons. Nach Verseifen des Acetylrestes erhält man das freie Oxy-lacton $C_{22}H_{28}O_3$, das überraschenderweise an Stelle der erwarteten 23 Kohlenstoffatome nur 22 Kohlenstoffatome besitzt. Bei der Spaltungsreaktion sind also noch weitere 4 Mol Wasser und außerdem auch ein Kohlenstoffatom (in Gestalt von Formaldehyd) abgesprengt worden. Über die Konstitution dieses Stoffes lassen sich vorläufig keine näheren Aussagen machen.

Oùabain, glänzende Tafeln aus heißem Wasser, Schmp. wasserfrei 187 bis 188°, $[\alpha]_D^{20} = -30{,}8°$ (Wasser). Anhydro-oùabain-heptaacetat, Schmp. 283 bis 285°, $[\alpha]_D^{21} = -59{,}1°$ (Pyridin).

Periplocymarin[43]). Eng verwandt mit der Familie der Apocynaceen, die eine Anzahl herzgiftführender Pflanzen umfaßt, ist die Familie der Asclepiadaceen; zu der letzteren gehört die Periploca graeca. In dieser Pflanze kommt, wie wir durch die Arbeiten von Lehmann[44]) wissen, das Herzgift Periplocin vor. Bei der Spaltung mit Säuren erhält man aus diesem Glycosid das Aglucon Periplogenin.

[42]) J. biol. Chem. 96, 647 (1932).

[43]) Jacobs u. Hofmann, J. biol. Chem. 79, 519 (1928).

[44]) Arch. Pharm. 235, 157 (1897).

Wenn man das Periplocin oder bequemer vorgereinigte Extrakte aus Periploca graeca an Stelle von Mineralsäure mit einem Enzympräparat behandelt, gelingt es, ein neues, noch zuckerhaltiges Spaltprodukt, das Periplocymarin, zu isolieren. Für die enzymatische Spaltung ist wiederum die Strophanthobiase aus Strophanthus courmonti-Samen geeignet. Nachdem die Substanz längere Zeit der Einwirkung des Strophanthobiase-Präparates ausgesetzt ist, läßt sich das Spaltprodukt, das Periplocymarin, mit Chloroform leicht ausschütteln. Das neue Glycosid kristallisiert leicht aus Methanol mit einem Mol Kristall-Methanol und ist in seinen Eigenschaften dem Cymarin sehr ähnlich. Das getrocknete Produkt hat die Formel $C_{30}H_{46}O_8$ und wird durch Säuren in Periplogenin und Cymarose gespalten:

$$\underset{\text{Periplocymarin}}{C_{30}H_{46}O_8} + H_2O = \underset{\text{Periplogenin}}{C_{23}H_{34}O_5} + \underset{\text{Cymarose}}{C_7H_{14}O_4}$$

Es erscheint demnach wahrscheinlich, daß das Periplocin von Lehmann ein Polysaccharid-glycosid des Periplogenins bzw. des Periplocymarins ist und analog dem K-Strophanthin-β enzymatisch in Periplocymarin und Glucose zerlegt werden kann.

Periplogenin ist ein einfach ungesättigtes Trioxy-lacton und ist mit Gitoxigenin isomer. Von den drei Hydroxylgruppen ist eine acylierbar.

Periplocymarin. Die Stengel und Zweige von Periploca graeca werden mit 70proz. Alkohol extrahiert und der Extrakt, nach der üblichen Vorreinigung, 7 Tage mit einem Strophanthobiase-Präparat behandelt. Danach läßt sich das Periplocymarin mit Chloroform ausschütteln.

Das Periplocymarin kristallisiert aus Methanol in glänzenden Nadeln, die ein Mol Kristall-Methanol enthalten; Schmp. 148°, Sintern ab 138°; $[\alpha]_D = +29°$ (Alkohol); spärlich löslich in Wasser, leicht löslich in Chloroform, praktisch unlöslich in Äther. Periplogenin: Aus Periplocymarin durch Hydrolyse mit verd. alkoholischer Salzsäure in der Kälte. Umkristallisieren aus verd. Alkohol, Schmp. 135—140° (Zers.). Der Schmelzpunkt ist indessen schwankend, es sind Schmp. bis 235° hinauf beobachtet worden. $[\alpha]_D = +31{,}5°$ (Alkohol), Periplogenin-benzoat, aus Alkohol, Schmp. 235°.

Uzarin. Das Uzarin ist der wirksame Bestandteil aus der Wurzel einer afrikanischen Gomphocarpus-Art. Die als Uzara bekannte Droge stellt den rohen Wurzelextrakt dar und wird verwendet „zur erfolgreichen Behandlung diarrhöischer Zustände der verschiedensten Ätiologie, aber auch zur Bekämpfung von Spasmen des Magen-Darm-Kanals, des Uterus (Dysmenorrhöe) und der Bronchien (Asthma-nervosum)“[47]).

Aus dieser Droge haben Hennig[45]) und Wolff[46]) ein Glycosid,

[45]) Arch. Pharm. 255, 382 (1917).

[46]) Inaug.-Dissertat. Marburg 1925.

das Uzarin, gewonnen. Windaus und Haack[47]) haben das Uzarin rein dargestellt. Nach den neusten Untersuchungen von Tschesche[48]) besitzt es die Zusammensetzung $C_{35}H_{54}O_{14}$, $2\,H_2O$. Es ist ein Lacton und gibt die Legalsche Probe. Bei der Hydrolyse liefert es das Anhydro-uzarigenin $C_{23}H_{32}O_3$ und zwei Mol Glucose. Das Anhydro-uzarigenin ist sehr wahrscheinlich ein sekundär entstandenes Spaltprodukt. Das ursprüngliche Genin hat die Formel $C_{23}H_{34}O_4$; es verliert unter den energischen Bedingungen, die zur Hydrolyse angewendet werden müssen, ein Mol Wasser. Die Spaltung des Uzarins verläuft also nach folgenden Gleichungen:

$$\underset{\text{Uzarin}}{C_{35}H_{54}O_{14}} + 2\,H_2O = \underset{\text{(Uzarigenin)}}{C_{23}H_{34}O_4} + \underset{\text{Glucose}}{2\,C_6H_{12}O_6}$$

$$\underset{\text{(Uzarigenin)}}{C_{23}H_{34}O_4} = \underset{\text{Anhydro-uzarigenin}}{C_{23}H_{32}O_3} + H_2O$$

Anhydro-uzarigenin ist ein zweifach ungesättigtes Mono-oxy-lacton. Die Hydroxylgruppe ist sekundärer Natur. Bei der katalytischen Hydrierung bildet sich ein Tetrahydroprodukt von der Zusammensetzung $C_{23}H_{36}O_3$, das mit den Perhydroderivaten des Dianhydro-gitoxigenins und des Anhydro-digitoxigenins isomer ist.

Uzarin: Darst. s. Windaus u. Haack[47]).

Uzarin kristallisiert in großen Prismen vom Schmp. 268—270°; $[\alpha]_D = -27{,}0°$ (Pyridin); leicht löslich in Pyridin und heißem Glykol-monomethyläther, sehr schwer löslich in Wasser, fast unlöslich in Chloroform, Aceton und Äther.

α-Anhydro-uzarigenin. Uzarin wird durch Erwärmen mit 5proz. alkoholischer Schwefelsäure gespalten. Das in Aethylalkohol schwer lösliche Anhydro-uzarigenin fällt größtenteils aus und wird durch Umkristallisieren aus Pyridin gereinigt. Es kristallisiert fast nur das α-Anhydro-uzarigenin wieder aus, während das β-Anhydro-uzarigenin in den Mutterlaugen verbleibt. Der Schmp. des α-Anhydro-uzarigenins liegt bei 263—265°, $[\alpha]_D = -29{,}5°$ (Chloroform); ziemlich leicht löslich in Pyridin, ziemlich schwer löslich in Äther und Wasser. Acetyl-derivat, lange Nadeln aus wäßrigem Alkohol, Schmp. 175°. p-Nitro-benzoyl-derivat, Nadeln aus Alkohol, Schmp. 246°.

C III. Die Konstitution der wichtigsten Herzgiftgenine

C IIIa. Das Ringsystem

Die Vermutung, daß den Herzgiftgeninen dasselbe tetracyclische Ringsystem zu Grunde liegt wie den Sterinen und Gallensäuren, ist schon

[47]) B. 63, 1377 (1930).
[48]) Tschesche und Bohle, B. 68, 2252 (1935).

vor langer Zeit von Windaus[1]) ausgesprochen worden. Aber erst in neuerer Zeit ist es gelungen, diese Vermutung auf experimenteller Grundlage zu bestätigen und die engen strukturellen Zusammenhänge dieser Stoffklassen klarzulegen.

Den ersten experimentellen Hinweis darauf, daß Sterine und Herzgifte einen sehr ähnlichen Bau besitzen, vermittelten die Ergebnisse der Selendehydrierung. Bei der Selendehydrierung des Anhydro-uzarigenins[49]) und des Strophanthidins[50]) konnte der Kohlenwasserstoff $C_{18}H_{16}$ erhalten werden, den Diels und Mitarbeiter nach der gleichen Methode aus Cholesterin und Cholsäure dargestellt hatten. Die Bildung des γ-Methyl-cyclopenteno-phenanthrens ist charakteristisch für solche Stoffe, die das gleiche tetracyclische Kohlenstoffgerüst besitzen wie die Sterine und Gallensäuren.

Ein anderer Beweis für den konstitutionellen Zusammenhang zwischen Sterinen und Herzgiften wurde dadurch erbracht, daß es gleichzeitig Tschesche[51]) in Göttingen und Jacobs[52]) in New York gelang, durch oxydativen Abbau von Herzgiftderivaten zu bekannten Stoffen der Gallensäurereihe zu gelangen.

Jacobs ging aus von der Digitoxanoldisäure $C_{23}H_{36}O_5$, einem Derivat des Digitoxigenins (Darstellung s. S. 215). Digitoxanoldisäure enthält eine sekundäre Hydroxylgruppe, die durch Oxydation mit Chromsäure zur Ketogruppe oxydiert werden kann. Durch Reduktion nach Clemmensen läßt sich die Ketogruppe durch CH_2 ersetzen und man gelangt hierdurch zu einer gesättigten, hydroxylfreien Dicarbonsäure $C_{23}H_{36}O_4$, der Digitoxandisäure. Diese Säure wurde nach der gleichen Methode abgebaut, die von Wieland, Schlichting und Jacobi zum Abbau der Seitenkette der Cholansäure benutzt worden war. Durch Umsetzung mit Phenylmagnesiumbromid wurde der Dimethylester der Digitoxandisäure zunächst in das entsprechende Bis-diphenylcarbinol verwandelt. Das letztere wurde dann energisch mit Chromsäure oxydiert und hierdurch unter Absprengung von 3 Kohlenstoffatomen in eine gesättigte einbasische Säure $C_{20}H_{32}O_2$ übergeführt. Diese Abbausäure erwies sich in jeder Hinsicht als identisch mit der Aetio-cholansäure, die von

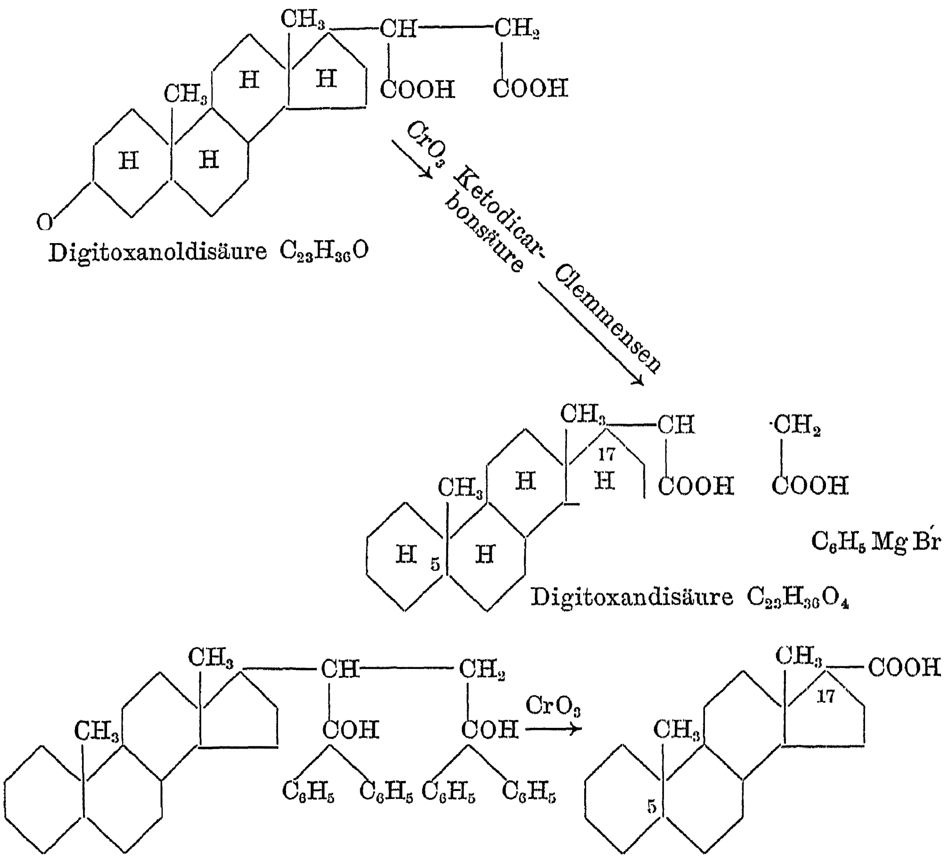
[49]) Tschesche u. Knick, H. 222, 58 (1933).

[50]) Jacobs u. Elderfield, Science 79, 279 (1934); J. biol. Chem. 107, 143 (1934); vgl. Jacobs u. Fleck, Science 73, 133 (1931); J. biol. Chem. 97, 57 (1932).

[51]) Tschesche, H. 229, 219 (1934); Angew. Chem. 47, 729 (1934).

[52]) Jacobs u. Elderfield, Science 80, 434 (1934); J. biol. Chem. 108, 497 (1934).

Wieland und Mitarbeitern aus Cholansäure dargestellt worden war. Da die Digitoxandisäure kein Malonsäure-Derivat ist, kann der Abbau nur in folgender Weise formuliert werden:



Aetio-cholansäure

Tschesche hat einen ähnlichen Abbau, ausgehend vom Anhydro-uzarigenin (s. S. 200) durchgeführt. Durch katalytische Hydrierung wurden aus Anhydro-uzarigenin zwei gesättigte, isomere Oxy-lactone α_1 und α_2 der Formel $C_{23}H_{36}O_3$ erhalten (s. S. 220), die genau wie oben beschrieben durch Chromsäureoxydation und Clemmensen-Reduktion über die Ketoderivate in die gesättigten, isomeren Lactone α_1 und α_2 der Formel $C_{23}H_{36}O_2$ umgewandelt werden konnten. In diesen Lactonen ließ sich durch energische Chromsäureoxydation die Lactonbrücke aufsprengen, wobei zwei Dicarbonsäuren $C_{23}H_{36}O_4$ erhalten wurden, die sowohl untereinander als auch mit der Digitoxandisäure isomer waren. Es gelang, aus beiden Dicarbonsäuren genau wie im Falle

der Digitoxandisäure über die Grignardverbindungen durch Chromsäureoxydation 3 Kohlenstoffatome abzusprengen. Aus den beiden Dicarbonsäuren $C_{23}H_{36}O_4$ erhielt man die gleiche Monocarbonsäure $C_{20}H_{32}O_2$. Diese Abbausäure erwies sich als identisch mit der Aetio-allo-cholansäure. Aetio-cholansäure und Aetio-allo-cholansäure unterscheiden sich nur durch die räumliche Lage des Wasserstoffatoms an dem asymmetrischen Kohlenstoffatom 5.

Durch diese Ergebnisse von Jacobs und von Tschesche, die sich gegenseitig ergänzen, ist der exakte Beweis dafür geliefert worden, daß die Herzgiftaglucone Digitoxigenin und Uzarigenin dasselbe charakteristische Vierringsystem besitzen wie die Sterine und Gallensäuren. Gleichzeitig ist damit auch festgestellt, daß die Genine eine Seitenkette von 4 Kohlenstoffatomen besitzen, welche die Lactongruppe enthält und gleichfalls am Kohlenstoffatom 17 haftet wie die Seitenkette in den Sterinen und Gallensäuren (s. Formel der Digitoxansäure).

Das Ausgangsmaterial von Jacobs, das Digitoxigenin, trägt am Kohlenstoffatom 5 keine Hydroxylgruppe, sondern ein Wasserstoffatom (s. S. 208) und beim Abbau zu der Aetio-cholansäure sollte am Kohlenstoffatom 5 keine Änderung der sterischen Lage erfolgt sein. Das Digitoxigenin gehört also höchstwahrscheinlich sterisch in die Reihe der Gallensäuren, in denen die Ringe A und B in cis-Stellung miteinander verknüpft sind. Uzarigenin trägt, wie Tschesche[48]) zeigen konnte, am C-Atom 5 kein Hydroxyl; es entspricht sterisch also sicherlich dem Typus der Allo-cholansäure.

Digitoxanondisäure $C_{23}H_{34}O_5$ (I): Durch Chromsäureoxydation von Digitoxanoldisäure. Voluminöse Nadeln, aus verd. Aceton, die bei 213—215° unter (Zers.) schmelzen.

Digitoxandisäure $C_{23}H_{36}O_4$: Aus I durch Clemmensenreduktion. Rhomben, die bei 218° unter (Zers.) schmelzen, Sintern bei 210°. Dimethylester glänzende Plättchen aus Methanol, Schmp. 103°.

Abbau des Digitoxandisäure-dimethylesters (II) zur Aetio-cholansäure: 4 g II werden mit einer Grignardlösung aus 20 ccm Brombenzol und 4,56 g Magnesium in 400 ccm trockenem Äther umgesetzt. Die Mischung wird 8 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach Zersetzung mit Eisessig und verd. Salzsäure wird das Carbinol mit Äther extrahiert und das Diphenyl durch Dampfdestillation entfernt. Das rohe Carbinol wird in 500 ccm heißer Essigsäure im Verlaufe einer Stunde mit 90 ccm einer 20proz. Chromsäurelösung versetzt. Nach weiterem 5stündigem Erhitzen wird die Essigsäure im Vakuum abgedampft, der Rückstand mit Wasser und Äther behandelt und die Ätherlösung mit Wasser und dann vorsichtig mit kleinen Mengen sehr verd. Sodalösung gewaschen (die Cholansäure bleibt im Äther). Aus dem Ätherrückstand wird das Benzophenon mit Wasserdampf

abgeblasen. Der Rückstand wird nun aus Essigsäure umkristallisiert; man erhält die Aetio-cholansäure in Nadeln vom Schmp. 219—219,5°, weiter identifiziert durch Methyl- und Aethylester (s. S. 53).

C IIIb. Die Lactongruppe

Die Herzgifte und deren Aglucone (mit Ausnahme des Scillarens und seines Genins) geben, wie schon erwähnt, in Pyridinlösung mit Nitroprussid-natrium unter Zusatz von etwas Alkali eine intensive Rotfärbung (Legaltest). Wenn man die in den Agluconen vorhandene Doppelbindung katalytisch hydriert, gelangt man zu gesättigten Dihydro-Derivaten, bei denen die Legalsche Probe negativ ausfällt[53]). Die positive Farbreaktion mit Nitroprussid-natrium scheint also an das Vorhandensein der Doppelbindung geknüpft zu sein. Jacobs ist durch diesen Befund zu der Annahme geführt worden, daß sich die Doppelbindung in der Nähe der Lactongruppe befindet. Zum Vergleich mit den Herzgiftgeninen hat er zwei einfach gebaute ungesättigte Lactone der Paraffinreihe, die Angelica-lactone, herangezogen[54]).



Δ-β-γ-Angelica-lacton Δ-α-β-Angelica-lacton

Er fand, daß das β-γ-ungesättigte Angelica-lacton mit Nitroprussid-natrium und Alkali wie die Genine der Herzgifte sofort eine intensive Rotfärbung gibt, während die α-β-Form unter denselben Bedingungen zunächst nur eine schwache Färbung zeigt, die sich aber allmählich vertieft und auch länger anhält als es bei dem β-γ-Isomeren der Fall ist. Das allmähliche Auftreten der roten Färbung bei der α-β-Verbindung kommt wahrscheinlich dadurch zustande, daß sich die α-β-Doppelbindung unter dem Einfluß des Alkali langsam in die β-γ-Stellung verlagert. Das Δ-β-γ-Angelica-lacton reduziert ebenfalls sofort ammoniakalische Silberlösung, eine Eigenschaft, die — wenn auch in weit schwächerem Maße — die Herzgiftgenine besitzen. Das Δ-α-β-Angelica-Lacton scheidet aus ammoniakalischer Silberlösung auch nach längerem Stehen kein Silber ab.

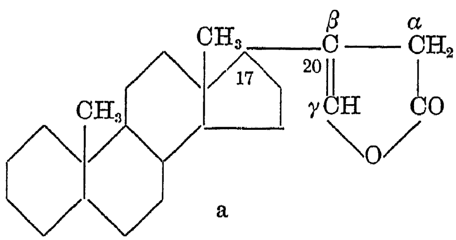
Jacobs[55]) ist daher zu der Ansicht gekommen, daß die Herz-

[53]) Windaus, Bohne u. Schwieger, B. 57, 1388 (1924); Cloetta, Arch. exp. Path. Pharm. 112, 324 (1926); Jacobs u. Hoffmann, J. biol. Chem. 74, 787 (1927).

[54]) Jacobs, Hoffmann u. Gustus, J. biol. Chem. 70, 1 (1926).

[55]) Jacobs u. Collins, J. biol. Chem. 64, 383 (1925).

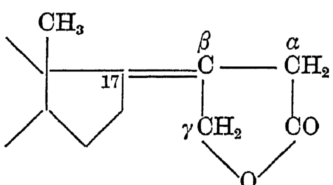
giftaglucone in Analogie zu diesen einfach gebauten Substanzen eine β-γ-ungesättigte Crotonsäure-lactongruppe besitzen, eine Annahme, die im Laufe der Zeit vollauf Bestätigung gefunden hat. Aus dem bisher Gesagten ergibt sich nunmehr für das Kohlenstoffgerüst der Genine einschließlich der ungesättigten Lactongruppe folgendes Strukturbild:



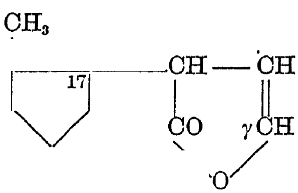
a

Bezüglich der Lactonseitenkette ist noch folgendes hinzuzufügen:

1. Nur mit einer β-γ-Stellung der Doppelbindung innerhalb des Lactonrings (nicht außerhalb des Lactonrings, wie in Formel b) läßt sich die Bildung der Reaktionsprodukte verstehen (s. S. 207), die aus den Geninen durch Einwirkung von Alkali entstehen.

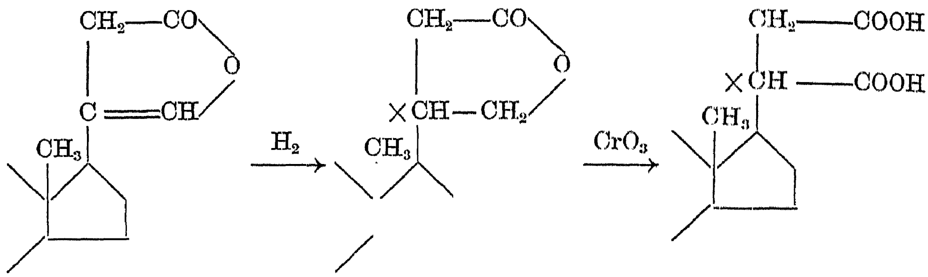


b

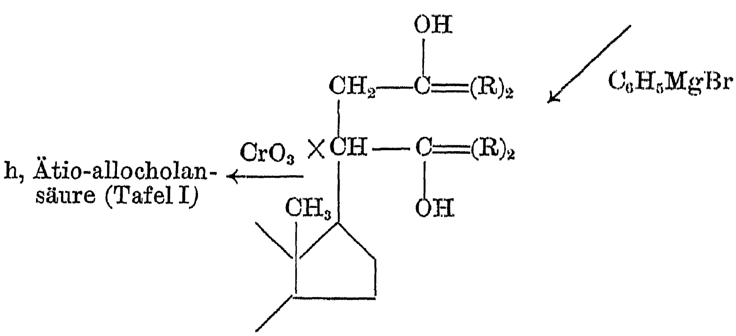


2. Die Annahme, daß die Lactonseitenkette mit ihrem β-Kohlenstoffatom mit dem Ringsystem verbunden ist (auch das α-C-Atom käme hierfür zunächst in Betracht, Formel c), wird in eindeutiger Weise durch die schon erwähnten Abbauversuche von Tschesche erhärtet (Formelreihe d—h): Das zweifach ungesättigte Anhydro-uzarigenin (d) liefert bei der Hydrierung zwei isomere Tetrahydro-Derivate α_1 und α_2 (e), die (nach Eliminierung der sekundären Hydroxyle im Ring A) unter Aufspaltung der Lactongruppe zu zwei isomeren Dicarbonsäuren (α_1 u. α_2, f) oxydiert werden können; diese liefern beim Grignard-Abbau (g) unter Absprengung von 3 C-Atomen dieselbe Monocarbonsäure $C_{20}H_{32}O_2$, die Aetio-allo-cholansäure (h). Die Isomerie der beiden gesättigten Lactone α_1 und α_2 (e) bzw. der beiden daraus hervorgehenden Dicarbonsäuren $C_{23}H_{36}O_4$ (f) kann daher nur durch ein asymmetrisches Kohlenstoffatom der Seitenkette (mit × gekennzeichnet) bedingt sein. Von die-

sem Kohlenstoffatom muß ferner im Anhydro-uzarigenin (d) eine Doppelbindung ausgehen, bei deren Hydrierung die beiden isomeren gesättigten Lactone α_1 und α_2 (e) gebildet werden. Diesen Anforderungen entspricht nur das Kohlenstoffatom 20 (Formel a), das bei der Oxydation zur Carboxylgruppe wird. In einem Stoff der Formel c kann in der Seitenkette durch Hydrierung kein neues asymmetrisches Kohlenstoffatom gebildet werden.

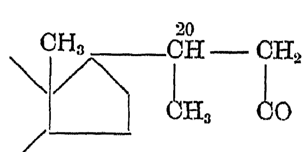


d



g

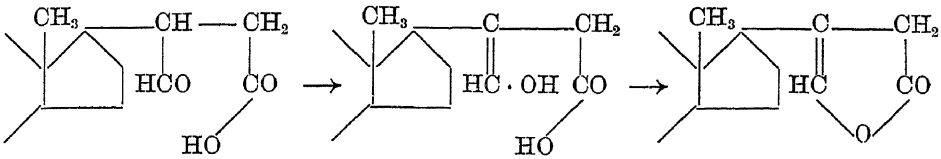
In den Herzgiftgeninen ist also die Seitenkette der Sterine auf vier Kohlenstoffatome verkürzt. Man kann sich diese Umwandlung nach W i n d a u s[56]) so vorstellen, daß in der Nor-cholansäure (i)



H

die Methylgruppe am C-Atom 20 der Seitenkette zur Aldehydgruppe oxydiert worden ist und diese mit dem Carboxyl ein Enol-lacton gebildet hat (k → l → m):

[56]) Nachr. Ges. Wiss. Math.-Phys. Kl. Göttingen 1935, 59.



C IIIc. Deutung der Isomerisierung mit Alkalien

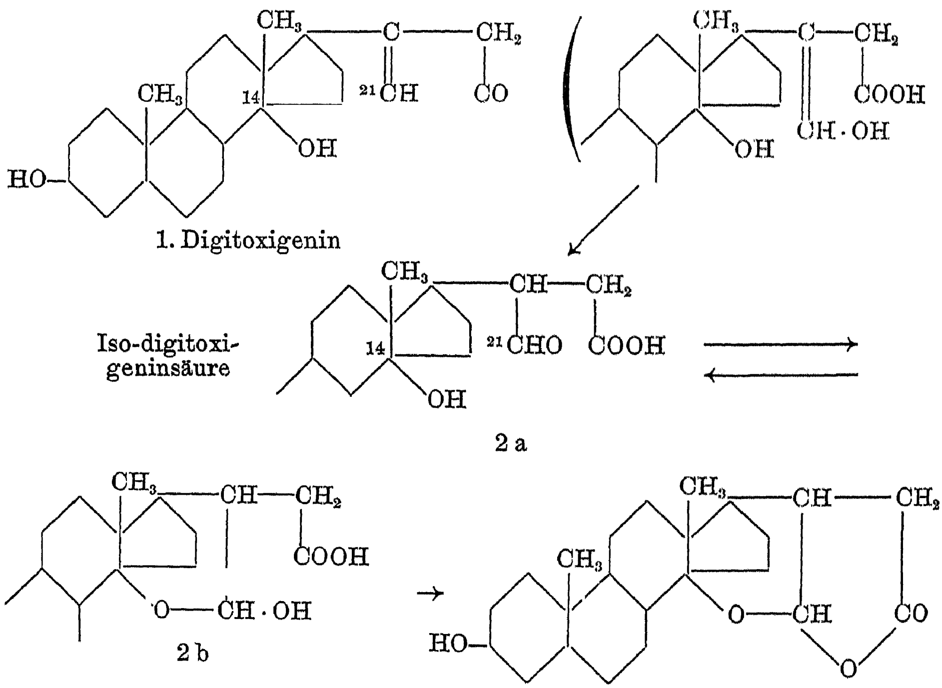
Die Herzgifte und deren Genine (mit Ausnahme des Digitaligenins) erleiden bei der Behandlung mit Alkali eine komplizierte Umlagerung. Das Studium der hierbei gebildeten Stoffe war schon von Kiliani begonnen und später von Windaus fortgesetzt worden; Jacobs und Gustus[57]) ist es gelungen, den Mechanismus dieser Isomerisierung zu klären. Die Reaktionen seien am Beispiel des Digitoxigenins erläutert.

Wenn man das Digitoxigenin $C_{23}H_{34}O_4$ in der Wärme mit alkoholischer Lauge behandelt, wird der Lactonring unter Verbrauch von einem Mol Alkali geöffnet (hierauf beruht die Lactontitration der Herzgifte bzw. deren Genine nach Windaus). Es entsteht das Salz einer Monocarbonsäure, von Jacobs als Iso-digitoxigeninsäure (iso-digitoxigeninic acid) bezeichnet (Kilianis Dixgensäure). Wird die alkalische Lösung vorsichtig mit Essigsäure angesäuert, erhält man die freie Iso-digitoxigeninsäure $C_{23}H_{36}O_5$, die sich sehr leicht — besonders bei Gegenwart von überschüssiger Mineralsäure — wieder anhydrisiert. Hierbei wird aber nicht das Ausgangsmaterial zurückgebildet, sondern es entsteht eine isomere Verbindung, das Iso-digitoxigenin $C_{23}H_{34}O_4$; (unter bestimmten Bedingungen scheidet sich die Iso-Verbindung zum Teil schon direkt aus der alkalischen Lösung ab). Das Iso-digitoxigenin läßt sich wieder zur Iso-digitoxigeninsäure verseifen.

Das Iso-digitoxigenin enthält nicht mehr die reaktionsfähige Doppelbindung des ursprünglichen Genins, denn es läßt sich katalytisch nicht hydrieren und gibt keine positive Legalsche Probe mehr. Es läßt sich auch nicht mehr durch Behandeln mit alkoholischer Salzsäure in ein Anhydroprodukt überführen; die tertiäre Hydroxylgruppe, die ursprünglich im Digitoxigenin vorhanden war, liegt also nicht mehr in freier Form vor. Dagegen liefert die Iso-Verbindung noch ein Acetylderivat und ein Keton, besitzt also noch die sekundäre Hydroxylgruppe des Digitoxigenins. Das Digitoxigenon, das Keton des Digitoxigenins, läßt sich gleichfalls isomerisieren und gibt dabei ein Iso-digitoxigenon, das mit dem Oxydationsprodukt des Iso-digitoxigenins identisch ist. Die sekundäre Hydroxylgruppe ist also an der Isomerisierung nicht beteiligt.

[57]) Jacobs u. Gustus, J. biol. Chem. 78, 573 (1928); 74, 811 (1927).

Diese Befunde lassen sich nach J a c o b s auf folgende Weise deuten. Im Digitoxigenin liegt ein β-γ-ungesättigtes Dioxy-lacton vor, dessen tertiäres Hydroxyl sich in reaktionsfähiger Stellung zur Lactongruppe befindet (1). Für die Haftstelle des tertiären Hydroxyls kommt nur das C-Atom 14 in Frage, das sich in δ-Stellung zur Aldehydgruppe (C-Atom 21) befindet, denn nur für diesen Fall läßt sich die leichte Entstehung der Iso-Verbindung unter Ausbildung eines beständigen Sechsringes erklären. B e i d e r A u f s p a l t u n g d e r L a c t o n g r u p p e d u r c h A l k a l i e n e n t s t e h t d a s S a l z e i n e r A l d e h y d c a r b o n s ä u r e, d e r I s o - d i g i t o x i g e n i n s ä u r e (2a). Aus dieser Säure bildet sich das neutrale Iso-digitoxigenin auf folgende Weise: Das tertiäre Hydroxyl reagiert mit der Aldehydgruppe unter Bildung eines Lactols (2b), das Lactol-hydroxyl und die Carboxylgruppe bilden unter Wasseraustritt ein Lacton (3); das Iso-digitoxigenin ist also gleichzeitig Lactol und Lacton.



1. Digitoxigenin

Iso-digitoxigeninsäure

2 a

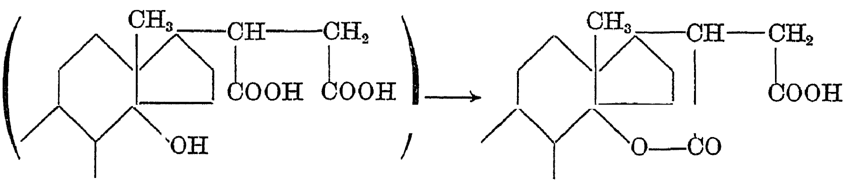
2 b

3. Iso-digitoxigenin

Die Iso-digitoxigeninsäure kann in zwei tautomeren Formen reagieren, in der Oxy-aldehydform (2a) und in der Lactolform (2b). Das Vorhandensein einer freien Aldehydgruppe wird dadurch bewiesen, daß der Ester der Iso-digitoxigeninsäure ein Semicarbazon zu bilden vermag.

Weiterhin läßt sich die Aldehydgruppe zu einer Carboxylgruppe oxydieren: Wenn man auf die Iso-digitoxigeninsäure (2a) in alkalischer Lösung Hypobromit einwirken läßt, wird ein Atom Sauerstoff verbraucht und man erhält nach dem Ansäuern mit Mineralsäuren die Iso-digitoxigensäure $C_{23}H_{34}O_5$ (4) (iso-digitoxigenic acid), eine Lacton-carbonsäure. Das aus der Aldehydgruppe neu entstandene Carboxyl bildet mit der tertiären Hydroxylgruppe ein Lacton (2a ⟶ 4). Liegt die Substanz als Lactol vor, so wird dieses direkt zum Lacton dehydriert (2b ⟶ 4).

2a



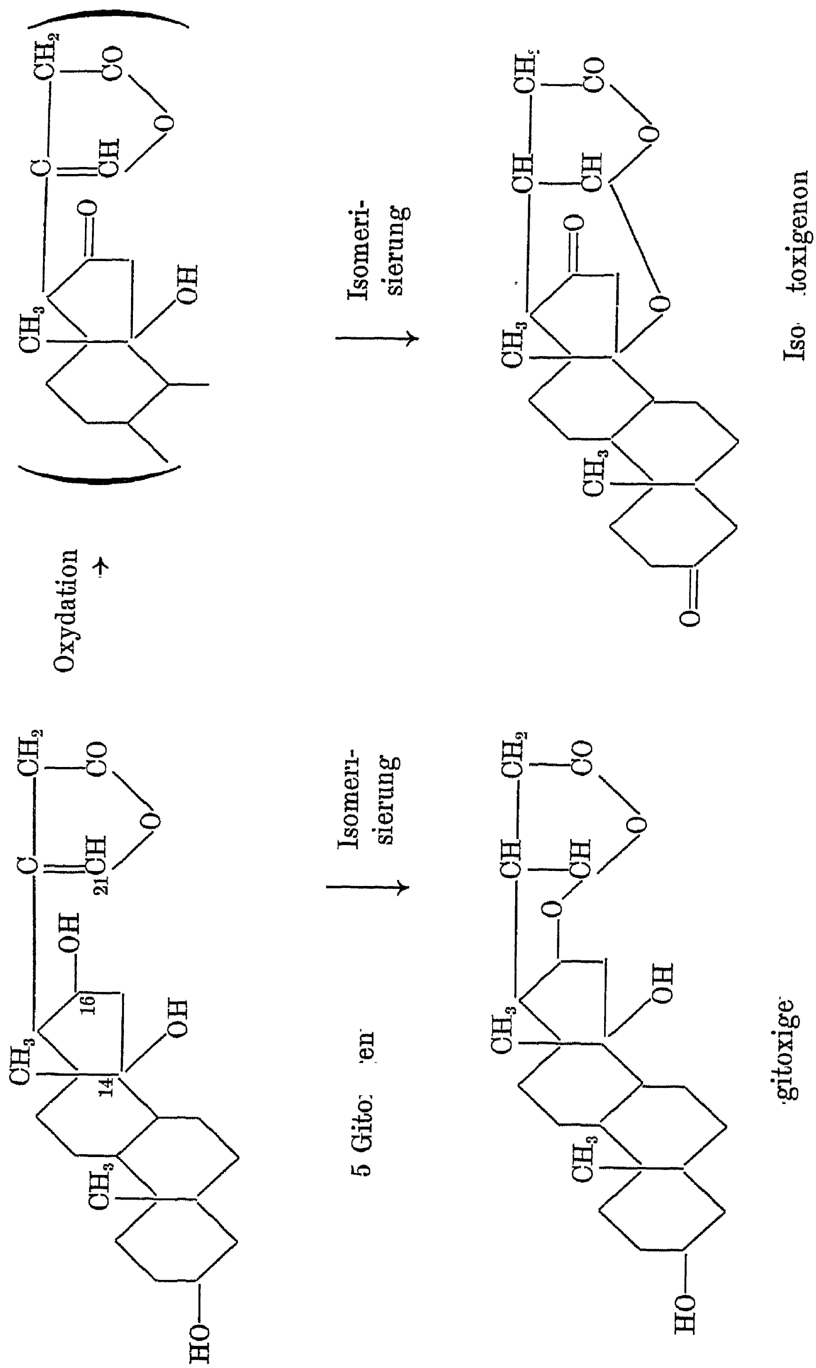
2b

4. Iso-digitoxigensäure

Die entstandene Iso-digitoxigensäure (4) verbraucht nunmehr bei der Verseifung — als Derivat einer Dicarbonsäure — 2 Mol Alkali. Nach der Verseifung erhält man beim Wiederansäuern unter Rückbildung der Lactongruppe die Iso-digitoxigensäure zurück.

Wird der Iso-digitoxigeninsäuremethylester (Methylester von 2a oder 2b) in essigsaurer Lösung mit Chromsäureanhydrid oxydiert, so geht er ebenfalls in ein Lacton über; gleichzeitig wird das im Ring A vorhandene Hydroxyl zu Carbonyl oxydiert und Iso-digitoxigonsäureester gebildet.

Die gleiche Isomerisierung, deren einzelne Phasen eben am Beispiel des Digitoxigenins erläutert wurden, erleiden Strophanthidin und Periplogenin. Beim Gitoxigenin (5) wird die Reaktion noch dadurch kompliziert, als sich hier nicht nur eine sondern 2 Hydroxylgruppen, eine tertiäre und eine sekundäre, in reaktionsfähiger Stellung zur Lactongruppe befinden. Der Sitz der tertiären OH-Gruppe ist wiederum am Kohlenstoffatom 14 anzunehmen. Da die beiden reaktionsfähigen Hydroxyle nicht benachbart stehen, kann das sekundäre „Extra“-Hydroxyl nur am C-Atom 16 seinen Platz haben (γ-Stellung zum C-Atom 21 der Lactonseitenkette). Bei der Isomerisierung des Gitoxigenins reagiert normalerweise dieses sekundäre Hydroxyl, denn im Iso-gitoxigenin (6) bzw. der Iso-gitoxigensäure ist noch ein freies tertiäres Hydroxyl vorhanden, das sich als Wasser abspalten läßt. Wenn man dagegen im Gitoxigenin (5) die beiden sekundären Hydroxyle zu Ketongruppen oxydiert, so unterliegt das primär gebildete normale Diketon gleichzeitig der Isomerisierung, wobei in der gleichen Weise wie bei den anderen Geninen das noch


Oxydation
Isomeri-
sierung
Isomeri-
sierung
5 Gito
gitoxige
Iso toxigenon

vorhandene tertiäre Hydroxyl mit der Enol-lactongruppe ein Lactol bildet; man erhält also in diesem Falle direkt das Iso-gitoxigenon (7).

Iso-digitoxigenin $C_{23}H_{34}O_4$[57]) (3): Digitoxigenin wird in der 10-fachen Menge 2,4%ig. methylalkohol. KOH gelöst; nach einigem Stehen werden die Kristalle abgesaugt. Blättchen oder Nadeln aus Alkohol, Schmp. 271°; spärlich lösl. in kaltem Methanol, praktisch unlöslich in Äther. Durch Ansäuern der alkalischen Mutterlauge bis zur kongosauren Reaktion wird auch der verseifte Teil in die neutrale Isoverbindung übergeführt; diese zweite Kristallfraktion ist identisch mit dem direkt erhaltenen Iso-digitoxigenin.

Iso-digitoxigeninsäure $C_{23}H_{36}O_5$ (2a) (iso-digitoxigeninic acid)[57]): Iso-digitoxigenin wird in 50proz. Alkohol mit einem kleinen Überschuß von verd. Natronlauge durch vorsichtiges Erwärmen gelöst. Nach dem Abkühlen wird mit Essigsäure schwach angesäuert, worauf die Iso-säure auskristallisiert. Lange Plättchen oder flache Nadeln, aus 50proz. Alkohol, Schmp. 250°. Methylester, Prismen oder Tafeln aus wenig Methanol, Schmp. 128°. Methylester-semicarbazon, derbe Prismen und Tafeln aus verd. Methanol, Zers. 156°.

Iso-digitoxigensäure $C_{23}H_{34}O_5$ (4) (iso-digitoxigenic acid)[57]): 0,15 g Iso-digitoxigenin werden in 2 ccm Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 2 ccm 0,5-n Natronlauge entsteht ein dicker Brei, der durch schwaches Erwärmen wieder klar wird. Die abgekühlte Lösung wird mit Essigsäure neutralisiert und dann mit einer Lösung von 0,15 g Brom in 2,25 ccm 1-n Natronlauge versetzt. Nach einer Stunde wird das Reaktionsprodukt mit Salzsäure ausgefällt, Tafeln oder Prismen aus Alkohol-Wasser, vom Schmp. 229° (vorh. Sintern).

Iso-digitoxigonsäuremethylester $C_{24}H_{34}O_5$[57]): Der Ester von 2a wird mit Kilianischer Chromsäurelösung oxydiert. Umkristallisieren aus verd. Methanol, Schmp. 190° (vorh. Sintern). Iso-digitoxigonsäure $C_{23}H_{32}O_5$, durch alkalische Verseifung des vorstehenden Esters. Dünne Blättchen aus verd. Alkohol, Schmp. 212—213° (nach vorh. Sintern).

Iso-gitoxigenin $C_{23}H_{34}O_5$ (6)[58]): Gitoxigenin (5) wird bei 25° mit 10proz. methylalkoholischer Kalilauge behandelt. Nach Umkristallisieren aus Alkohol sintert die Iso-Verbindung bei etwa 220° und schmilzt bei 252°.

Iso-gitoxigeninsäure $C_{23}H_{36}O_6$[59]): Aus 6 durch Verseifung mit verd. alkoholischer Lauge in der Wärme. Beim Ansäuern mit Essigsäure scheidet sich die Säure in mikroskopischen Stäbchen ab. Nadeln aus Alkohol, Zers. 146 bis 149°; aus schwach ammoniakalischer Lösung mit Essigsäure gefällt, erhält man die Säure in Nadeln, die bei 152—153° schmelzen. Methylester, Platten aus verd. Methanol, Schmp. 145°.

Iso-gitoxigensäure $C_{23}H_{34}O_6$[58]): Iso-gitoxigeninsäure wird in Wasser durch Zusatz von einigen Tropfen verd. Sodalösung gelöst und dann durch Zusatz von alkalischer Bromlösung oxydiert. Zur Reinigung wird die Substanz in 50proz. Alkohol durch Zugabe von Ammoniak gelöst. Beim Wieder-

[58]) Jacobs u. Gustus, J. biol. Chem. 86, 199 (1930); 82, 407 (1929); 79, 553 (1928).

[59]) Jacobs u. Elderfield, J. biol. Chem. 92, 313 (1931).

ansäuern der Lösung und Verdünnen kristallisiert die Säure in Blättchen vom Schmp. 260° aus; $[\alpha]_D = -50°$ (Alkohol).

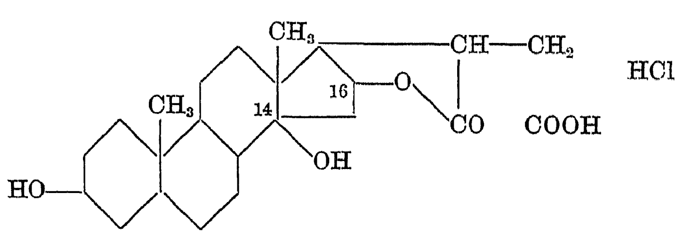
C III d. Die strukturellen Beziehungen der Genine untereinander

Im folgenden sei geschildert, wie es gelungen ist, Strophanthidin und Periplogenin, Periplogenin und Digitoxigenin, Digitoxigenin und Gitoxigenin, Periplogenin und Uzarigenin jeweils in identische Umwandlungsprodukte überzuführen und hierdurch sämtliche Genine genetisch miteinander zu verknüpfen. Da bei diesen Umwandlungsreaktionen das Kohlenstoffgerüst der betreffenden Genine nicht abgebaut oder verändert wird, so folgt aus diesen Ergebnissen, daß den Geninen Strophanthidin, Periplogenin und Gitoxigenin dasselbe Kohlenstoffskelett zu Grunde liegt, wie es für das Digitoxigenin und das Uzarigenin in den vorangehenden Kapiteln bewiesen worden ist.

1. Gitoxigenin — Digitoxigenin[58])

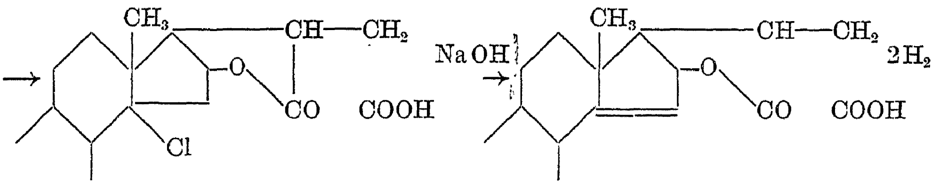
Im vorangehenden ist die Konstitution des Digitoxigenins (bis auf die Stellung des Hydroxyls im Ring A) abgeleitet und bewiesen worden. Das Gitoxigenin $C_{23}H_{34}O_5$ unterscheidet sich rein formelmäßig vom Digitoxigenin $C_{23}H_{34}O_4$ nur dadurch, daß es eine Hydroxylgruppe mehr besitzt. Man hatte schon seit langem vermutet, daß dies den einzigen Unterschied zwischen den beiden Geninen darstellt, und daß das Gitoxigenin ein Oxy-Derivat des Digitoxigenins ist. Den Beweis hierfür liefern die folgenden Reaktionen.

Das Gitoxigenin wurde zunächst in bekannter Weise über die Iso-Verbindung in die Iso-gitoxigeninsäure umgewandelt und die letztere durch Hypobromit zur Iso-gitoxigensäure oxydiert. Wir müssen uns daran erinnern, daß im Gitoxigenin eine tertiäre und eine sekundäre Hydroxylgruppe in reaktionsfähiger Nähe (C_{14} u. C_{16}) der Lactongruppe stehen, und daß bei der normalen Isomerisierung im Gegensatz zu den anderen Geninen das sekundäre Hydroxyl (C-Atom 16) an der Lactolbildung beteiligt ist. Demzufolge ist in der Iso-gitoxigensäure das tertiäre Hydroxyl am C_{14} frei:



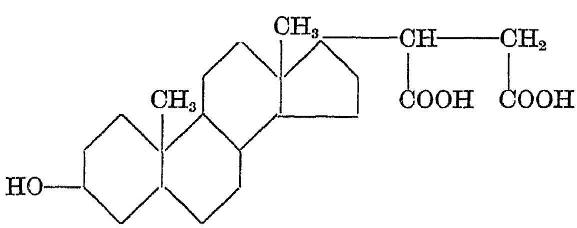
Iso-gitoxigensäure

Wenn man die Iso-gitoxigensäure (iso-gitoxigenic acid) (s. S. 211) bei Zimmertemperatur mit konz. Salzsäure behandelt, wird die tertiäre Hydroxylgruppe durch Chlor ersetzt und man erhält γ-Chlor-iso-gitoxigensäure (die Bezeichnung γ soll andeuten, daß während der Substitution eine Isomerisierung an einem der asymmetrischen Kohlenstoffatome stattgefunden hat; wenn man das Chloratom wieder durch Hydroxyl ersetzt, gelangt man zu einer isomeren Iso-gitoxigensäure). Durch Einwirkung von alkoholischer Natronlauge läßt sich aus dem Chlorderivat Salzsäure abspalten, wobei eine ungesättigte Verbindung, die Anhydro-γ-iso-gitoxigensäure gebildet wird:



γ-Chlor-iso-gitoxigensäure Anhydro-γ-iso-gitoxigensäure

Bei der katalytischen Hydrierung des Methylesters dieser Säure wurden unerwarteterweise zwei Mol Wasserstoff aufgenommen. Das Reaktionsprodukt erwies sich als der Monomethylester einer zweibasischen Säure $C_{23}H_{36}O_5$. Bei der Hydrierung wurde die ungesättigte Verbindung unter gleichzeitiger reduktiver Aufspaltung der Lactongruppe in eine gesättigte Desoxysäure verwandelt. Diese aus Gitoxigenin erhaltene zweibasische Säure heißt Digitoxanoldisäure (9) und diente als Ausgangsmaterial für den schon beschriebenen Abbau zur Aetio-cholansäure.

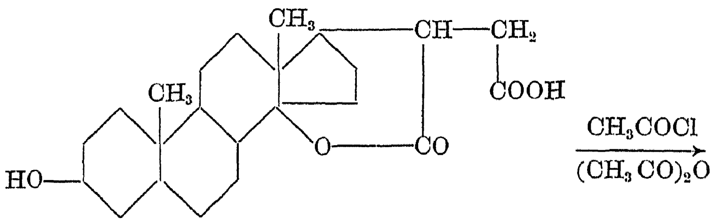


9. Digitoxanoldisäure

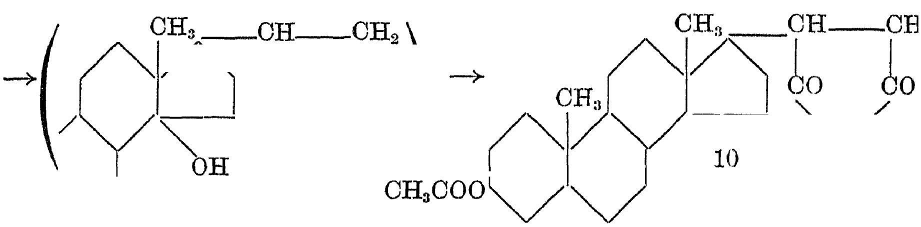
Die gleiche Säure konnte auch aus Digitoxigenin auf folgendem Wege dargestellt werden:

Iso-digitoxigensäure (s. S. 209) wird durch konz. Salzsäure zur γ-Iso-digitoxigensäure isomerisiert. Bei dieser Reaktion findet nur eine Umlagerung an einem der asymmetrischen Kohlenstoffatome statt. Wenn man die γ-Säure mit einer Mischung von Essigsäureanhydrid und Acetylchlorid erhitzt, wird die Lactongruppe unter Bildung eines substitu-

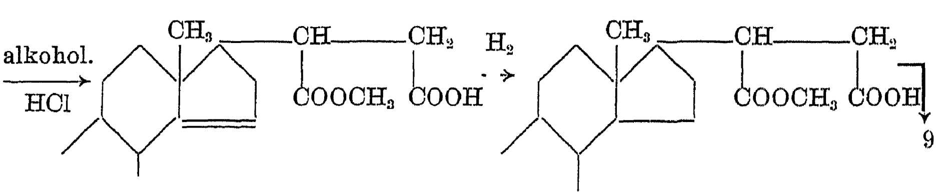
ierten Bernsteinsäure-anhydrids geöffnet, während gleichzeitig die freigelegte tertiäre Hydroxylgruppe als Wasser abgespalten wird. Es entsteht das Acetat (Acetylierung der sekundären Hydroxylgruppe im Ring A) des γ-Digitoxenol-dicarbonsäureanhydrids (10). Diese Reaktionen sind folgendermaßen zu formulieren:



γ-Iso-digitoxigensäure



Durch vorsichtige Behandlung dieses Anhydrids mit methylalkoholischer Salzsäure wird unter Öffnung des Anhydridringes der Halbester gebildet, der durch Hydrierung der Doppelbindung glatt in das Acetat des (γ-)Digitoxanol-dicarbonsäure-monomethylesters übergeführt wird. Die hieraus durch Verseifung erhaltene (γ-)Digitoxanol-disäure ((γ-)digitoxanol-diacid) ist in allen Einzelheiten mit der entsprechenden Säure (9) aus Gitoxigenin identisch.



C h l o r - γ - i s o - g i t o x i g e n s ä u r e $C_{23}H_{33}O_5Cl$[58]): Iso-gitoxigensäure (s. S. 211) wird bei Zimmertemp. in der 10fachen Menge konz. HCl (1,19) gelöst. Die abgeschiedene Chlor-säure wird aus Aceton umkrist.; lange, breite Blättchen, Schmp. 255° (Zers., vorh. Sint.); $[\alpha]_D = -101°$ (Alkohol).

A n h y d r o - γ - i s o - g i t o x i g e n s ä u r e $C_{23}H_{32}O_5$: Chlor-γ-iso-gitoxigensäure wird mit einer 5%ig. Lös. von NaOH in 50proz. Alkohol behandelt. Umkristallisieren durch Lösen in alkoholischem Ammoniak und Wiederansäuern mit Essigsäure; Schmp. 210°; $[\alpha]_D = +61°$ (Alkohol). Methylester, derbe Blättchen aus verd. Methanol, Schmp. 151°.

Digitoxanol-disäure-monomethylester $C_{23}H_{38}O_5$: Anhydro-γ-iso-gitoxigensäure-methylester wird mit Platin und Wasserstoff hydriert, wobei 2 Mol Wasserstoff aufgenommen werden. Umkristallisiert aus verd. Methanol, Schmp. 191—192°. Durch alkalische Verseifung erhält man aus dem Halbester die freie Dicarbonsäure, (γ)-Digitoxanol-disäure, Blättchen aus verd. Methanol, Schmp. 207° (Zers.); $[\alpha]_D = +5°$ (Alkohol). Dimethylester, aus Methanol, Schmp. 156—157°.

(γ)-Digitoxanol-disäure aus Digitoxigenin[58]).

γ-Iso-digitoxigensäure $C_{23}H_{34}O_5$: Iso-digitoxigensäure (s. S. 211) wird bei 25° in konz. Salzsäure (1,19) gelöst. Die ausgeschiedene isomere Säure wird in Ammoniak gelöst und nach Wiederansäuern mit Eisessig in hexagonalen Blättchen erhalten, Schmp. 118° (Zers.); $[\alpha]_D = +60°$ (Alkohol).

Acetat vom γ-Digitoxenol-disäure-anhydrid: 1 g γ-Iso-digitoxigensäure wird in einem Bombenrohr mit einer Mischung von 18 ccm Essigsäureanhydrid und 2 ccm Acetylchlorid 15 Stunden erhitzt; der neutrale Anteil des Reaktionsproduktes wird aus Methanol umkristallisiert, Blättchen vom Schmp. 182—184° (vorh. Sintern).

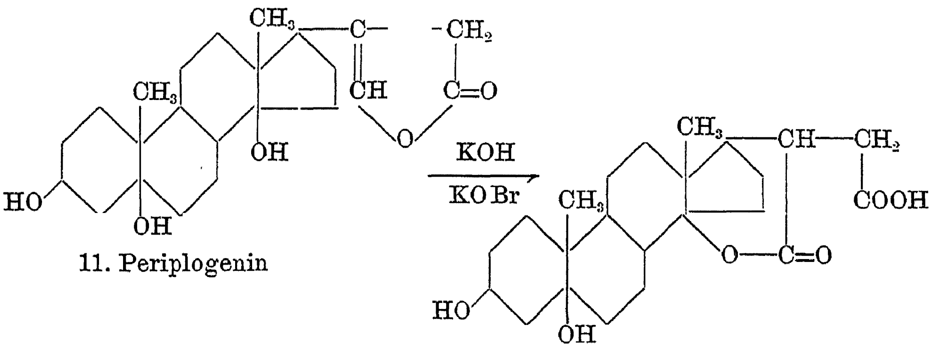
Acetat vom γ-Digitoxenol-disäure-monomethylester: 0,1 g γ-Digitoxenol-disäure-anhydrid-acetat werden mit 2 ccm 1proz. methylalkoholischer Salzsäure bis zur Auflösung erwärmt; dann wird die Lösung abgekühlt und verdünnt. Blättchen aus verd. Methanol, Schmp. 89°.

(γ)-Digitoxanol-disäure $C_{23}H_{36}O_5$: Der vorstehende Ester wird mit Platin und Wasserstoff hydriert (Schmp. 182°). Durch alkalische Verseifung des Halbesters erhält man die freie (γ)-Digitoxanol-disäure; umkristallisieren aus verd. Methanol, Schmp. 207°.

CIIId. 2. Digitoxigenin-Periplogenin[59])

Periplogenin ist ein Trioxy-lacton wie Gitoxigenin und unterscheidet sich ebenfalls vom Digitoxigenin nur durch den Mehrgehalt einer Hydroxylgruppe. Die Überführung des Periplogenins in ein Desoxy-Derivat, das mit einem Digitoxigenin-Derivat identisch ist, gelingt sehr leicht.

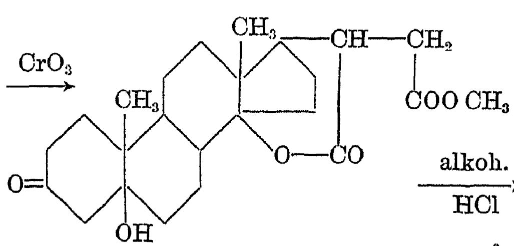
Zunächst wird Periplogenin (11) in bekannter Weise in Iso-periplogenin übergeführt und dieses mit alkalischer Bromlösung zur Iso-periplogensäure oxydiert (12).



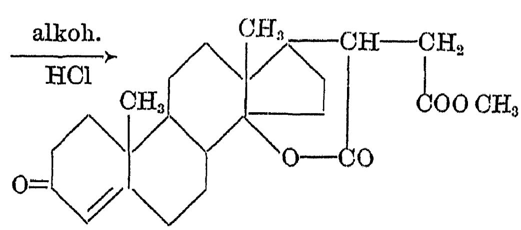
11. Periplogenin

12. Iso-periplogensäure

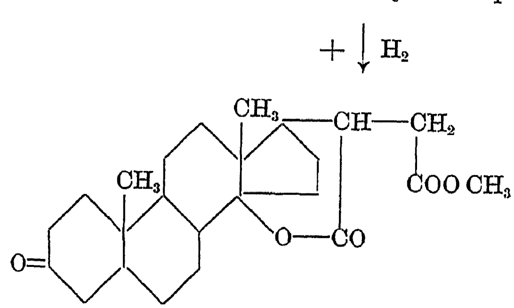
Iso-periplogensäure enthält noch zwei freie Hydroxylgruppen, eine sekundäre und eine tertiäre. Wenn man im Iso-periplogensäuremethylester das sekundäre Hydroxyl durch Oxydation mit Chromsäure in eine Ketogruppe verwandelt, gelangt man zum Iso-periplogonsäuremethylester (13). Die Oxydation zum Keto-ester hat zur Folge, daß nunmehr die noch freie tertiäre OH-Gruppe sehr labil geworden ist und sich leicht als Wasser abspalten läßt. Es ist daher anzunehmen, daß sich die Ketogruppe in β-Stellung zu dem labilen tertiären Hydroxyl befindet. Der bei der Wasserabspaltung entstandene einfach ungesättigte Anhydro-iso-periplogonsäuremethylester (14) läßt sich durch katalytische Hydrierung leicht in ein Gemisch isomerer Dihydro-Derivate überführen. Aus diesem Gemisch konnten durch fraktionierte Kristallisation zwei einheitliche isomere Dihydro-ester der Formel $C_{24}H_{34}O_5$ isoliert werden. Das leichtlösliche Isomere erwies sich als identisch mit dem Iso-digitoxigonsäuremethylester (s. S. 209). Periplogenin und Digitoxigenin unterscheiden sich also nur dadurch, daß das erstere eine tertiäre Hydroxylgruppe mehr besitzt als das Digitoxigenin. Die Übergänge lassen sich folgendermaßen veranschaulichen:



13. Iso-periplogonsäuremethylester



14. Anhydro-iso-periplogonsäuremethylester



Digitoxigenin

Iso-digitoxigonsäuremethylester
(Desoxy-iso-periplogonsäuremethylester)

Iso-periplogenin[60]: Aus Periplogenin durch Isomerisierung mit alkoholischer Kalilauge. Blättchen aus Alkohol, Schmp. 258°.

Iso-periplogensäure (12): Iso-periplogenin wird in Pyridin gelöst und durch Zusatz von verd. Natronlauge in der Kälte verseift. Nach Neutralisieren mit Essigsäure wird mit alkalischer Bromlösung oxydiert. Glänzende Blättchen aus verd. Alkohol, Schmp. 215—217° (Zers.). Methylester, Prismen aus Aceton, Schmp. 242°[61].

Iso-periplogonsäuremethylester $C_{24}H_{34}O_6$ (13)[61]: Iso-periplogensäureester wird in Eisessiglösung mit Kilianischer Chromsäurelösung bei Zimmertemperatur oxydiert; lange Nadeln aus Methanol, Schmp. 230°; $[\alpha]_D = -23{,}2°$ (Pyridin).

Anhydro-iso-periplogonsäuremethylester $C_{24}H_{32}O_5$ (14): 0,4 g (13) werden in einer Mischung von 30 ccm Methanol und 1,2 ccm konz. Salzsäure (1,19) 18 Min. zum Sieden erhitzt. Nach Verdünnen wird der Anhydro-Ester aus Methanol umkristallisiert; breite Nadeln oder flache Prismen, Schmp. 225—226°[59].

Desoxy-iso-periplogonsäuremethylester $C_{24}H_{34}O_5$ (Iso-digitoxigonsäuremethylester): 14 wird in Eisessiglösung mit Palladium und Wasserstoff hydriert. Das Gemisch der Hydrierungsprodukte wird aus Methanol fraktioniert kristallisiert, wobei man zunächst ein spärlich lösliches Produkt vom Schmp. 251—252° erhält. Wenn sich nach mehrfachem Einengen keine Kristalle vom Schmp. 251—252° mehr abscheiden, wird die Mutterlauge mit Wasser verdünnt und der Niederschlag aus Äther umkristallisiert; Plättchen vom Schmp. 192—193°, die mit Iso-digitoxigonsäuremethylester (s. S. 211) identisch sind; $[\alpha]_D = -40{,}5°$ (Alkohol). Durch alkalische Verseifung des Esters erhält man die freie Säure; flache Nadeln aus verd. Alkohol, Schmp. 206—208°.

CIII d. 3. Periplogenin-Strophanthidin

Das Strophanthidin $C_{23}H_{32}O_6$ (15) unterscheidet sich hinsichtlich seiner Zusammensetzung von den anderen Geninen im wesentlichen dadurch, daß es eine Aldehydgruppe besitzt. Durch Umwandlung dieser Aldehydgruppe in eine Methylgruppe würde man zu einem Stoff der Formel $C_{23}H_{34}O_5$ gelangen, der mit einem der eingangs aufgeführten Genine der gleichen Zusammensetzung identisch sein könnte.

Als Ausgangsmaterial für diese Umwandlung erwies sich ein Derivat des Strophanthidins, die Iso-strophanthidsäure $C_{23}H_{32}O_7$ (16) (α-iso-strophanthidic acid), am besten geeignet. Iso-strophanthidsäure erhält man durch Oxydation von Strophanthidin in alkalischer Lösung mit Hypobromit.

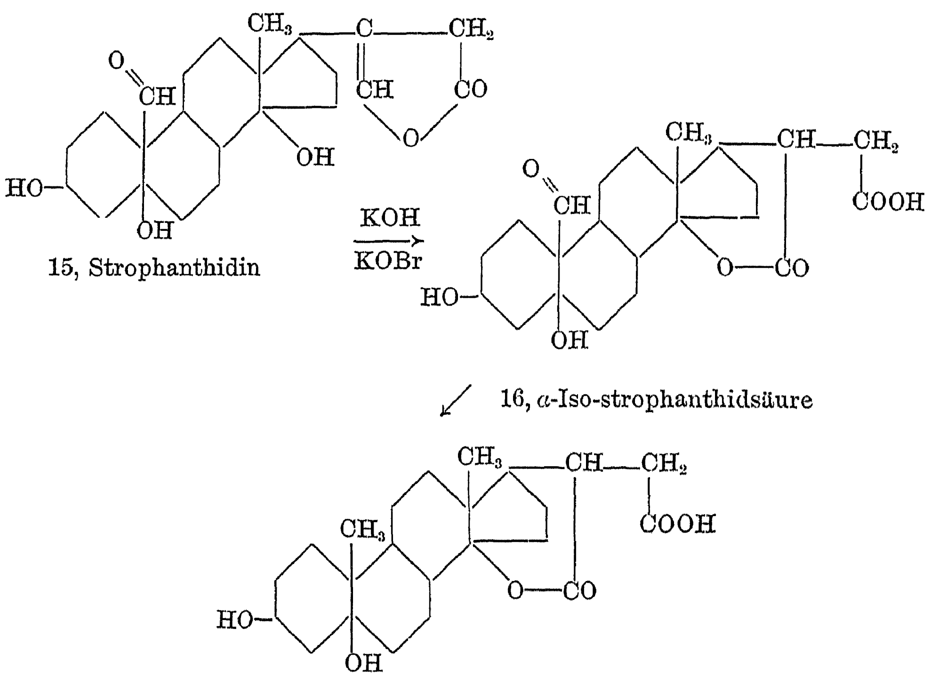
In der Iso-strophanthidsäure ist noch die ursprüngliche Aldehydgruppe vorhanden, wie aus der Bildung eines Semicarbazons hervorgeht. Wenn man das leicht erhältliche Semicarbazon mit Natriumäthylat nach

[60] Jacobs u. Hoffmann, J. biol. Chem. 79, 519 (1928).

[61] Jacobs u. Elderfield, J. biol. Chem. 91, 625 (1931).

der Methode von Wolff-Kishner behandelt, gelangt man zu einem carbonylfreien Reaktionsprodukt von der Zusammensetzung $C_{23}H_{34}O_6$. Diese Desoxo-säure erwies sich als identisch mit der eben beschriebenen Iso-periplogensäure (s. S. 215), einem Umwandlungsprodukt des Periplogenins.

Periplogenin unterscheidet sich vom Strophanthidin also nur dadurch, daß es an Stelle einer Aldehydgruppe eine Methylgruppe besitzt; Periplogenin kann man daher auch als Desoxo-strophanthidin bezeichnen. Die geschilderten Vorgänge lassen sich am besten durch folgende Strukturbilder veranschaulichen.



15, Strophanthidin

16, α-Iso-strophanthidsäure

Desoxo-α-iso-strophanthidsäure
(Iso-periplogensäure)

Iso-periplogensäure aus Strophanthidin[63])[62]):

α-Iso-strophanthidsäure: Strophanthidin wird in alkalischer Lösung bei Zimmertemperatur mit Hypobromit oxydiert. Glänzende Blättchen aus Alkohol, Schmp. 231—233° (Aufschäumen); $[\alpha]_D$ — 16,3° (Alkohol); auch

[62]) Jacobs, Elderfield, Grave u. Wignall, J. biol. Chem. 91, 617 (1931).

[63]) Jacobs u. Collins, J. biol. Chem. 61, 387 (1924).

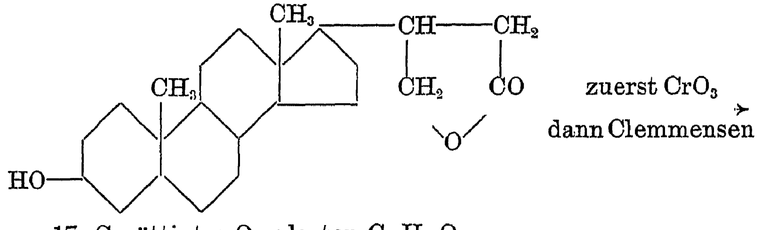
bei reinen Präparaten liegt der Schmp. manchmal 10—30° niedriger. Semicarbazon, Umkrist. aus verd. Alkohol, Schmp. 305°.

Iso-periplogensäure: α-Iso-strophanthidsäure-semicarbazon wird im Bombenrohr mit Natriumäthylat 16 Stunden auf 180° erhitzt. Das Reaktionsprodukt wird zunächst in acetonischer Lösung unter Zusatz von verd. HCl stehen gelassen (Lactonbildung). Die abgeschiedene Desoxosäure wird aus verd. Aceton umkristallisiert, Schmp. 215—217° (Zers.); $[\alpha]_D = -23{,}3°$ (Alkohol), unlöslich in Äther.

CIIId. 4. Periplogenin-Uzarigenin[64])

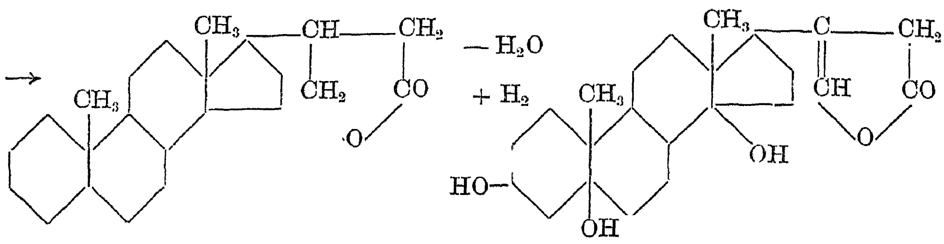
Uzarigenin und Periplogenin ließen sich auf sehr einfache Weise miteinander verknüpfen. Man brauchte in beiden Verbindungen nur die Hydroxyle durch Wasserstoff zu ersetzen und die Doppelbindungen zu hydrieren, um auf diese Weise zu identischen Lactonen der Formel $C_{23}H_{36}O_2$ zu gelangen.

Das Anhydro-uzarigenin-acetat wurde zunächst durch katalytische Hydrierung in ein Gemisch gesättigter Tetrahydro-Derivate übergeführt. Aus diesem Gemisch ließen sich durch fraktionierte Kristallisation zwei isomere Komponenten abtrennen, die durch Umesterung mit alkoholischer Salzsäure leicht die freien Genine, das α_1- und das α_2-Tetrahydro-anhydro-uzarigenin (17) lieferten. Wenn man in diesen beiden Oxylactonen die alkoholischen Hydroxyle mit Chromsäure zu Ketogruppen oxydiert und dann die Ketogruppen durch Reduktion nach Clemmensen in CH_2-Gruppen verwandelt, gelangt man zu isomeren gesättigten hydroxylfreien Lactonen der Formel $C_{23}H_{36}O_2$. Von diesen beiden isomeren Verbindungen erwies sich das α_2-Lacton (18) als identisch mit dem Oktahydro-trianhydro-periplogenin $C_{23}H_{36}O_2$. Diesen Stoff erhält man aus Periplogenin in sehr einfacher Weise dadurch, daß man sämtliche Hydroxylgruppen durch Erhitzen mit Salzsäure als Wasser abspaltet und die Doppelbindungen durch katalytisch erregten Wasserstoff absättigt. Diese Reaktionen lassen sich folgendermaßen veranschaulichen:



17. Gesättigtes Oxy-lacton $C_{23}H_{36}O_3$ aus Anhydro-uzarigenin

[64]) Tschesche, H. 222, 50 (1933).



18. Lacton $C_{23}H_{36}O_2$ Periplogenin

T e t r a h y d r o - a n h y d r o - u z a r i g e n i n - a c e t a t[64]): Anhydro-uzarigenin-acetat wird in Eisessiglösung mit einem Platinoxydkatalysator nach A d a m s und S h r i n e r hydriert. Das Reaktionsprodukt wird einer frakt. Krist. aus Essigester nach dem Dreieckschema unterworfen. In den am schwersten lösl. Anteilen sammelt sich das α_1-Tetrahydro-Produkt an. Es krist. aus Essigester in derben Prismen, die bei 248° schmelzen; $[\alpha]_D = +3{,}9°$ (Chloroform).

α_2 - T e t r a h y d r o - a n h y d r o - u z a r i g e n i n $C_{23}H_{36}O_3$ (17): Die niedriger als 230° schmelzenden Fraktionen der frakt. Krist. aus Essigester zur Gewinnung des α_1-Tetrahydro-Produktes werden mit alkohol. HCl erhitzt und das Reaktionsprodukt aus Essigester fraktioniert kristallisiert. Aus den am schwersten lösl. Anteilen erhält man das α_2-Tetrahydro-anhydro-uzarigenin, Schmp. 230°; $[\alpha]_D^{17} = +20{,}2°$ (Chloroform). Acetat, flache Prismen aus Essigester, Schmp. 205°; $[\alpha]_D^{18} = +20{,}2°$ (Chloroform).

α_2 - K e t o n $C_{23}H_{34}O_3$: 17 wird in Eisessiglösung mit der gleichen Menge Chromsäureanhydrid 30 Min. bei 30—40° oxydiert. Der neutrale Anteil liefert aus Essigester das α_2-Keton in warzenförmigen Kristallen, die bei 216—217° schmelzen.

α_2 - L a c t o n $C_{23}H_{36}O_2$ (Oktahydro-trianhydro-periplogenin) (18): Aus dem α_2-Keton durch Erhitzen mit amalgam. Zink und konz. HCl in Aethylalkohol. Feine Nadeln aus Alkohol, Schmp. 180°; $[\alpha]_D^{15} + 24{,}3°$.

O k t a h y d r o - t r i a n h y d r o - p e r i p l o g e n i n a u s P e r i p l o g e n i n[65]).

T r i a n h y d r o - p e r i p l o g e n i n $C_{23}H_{28}O_2$: Eine Lös. von 0,5 g Periplogenin in 5 ccm abs. Methanol, enthaltend 5% HCl-Gas, wird in einem Bombenrohr 15 Min. auf 100° erhitzt. Gelbe Nadeln vom Schmp. 191—193°; $[\alpha]_D^{24} = -130°$ (Pyridin).

O k t a h y d r o - t r i a n h y d r o - p e r i p l o g e n i n $C_{23}H_{36}O_2$: Aus Trianhydro-periplogenin durch Hydrierung in Eisessiglösung mit Platinoxyd. Durch Umkrist. des Hydrierungsproduktes aus wenig Alkohol erhält man reines Oktahydro-derivat vom Schmp. 177°, das mit Tetrahydro-anhydro-uzarigenin identisch ist.

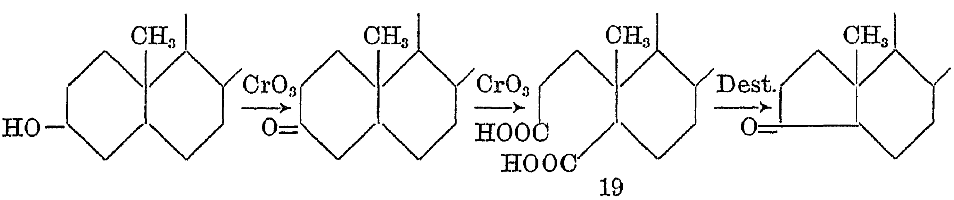
[65]) J a c o b s u. B i g e l o w, J. biol. Chem. 101, 697 (1933).

[66]) J a c o b s u. G u s t u s, J. biol. Chem. 74, 829 (1927).

C III e. Stellung einer Hydroxylgruppe an C-3

Zum Abschluß der Konstitutionsaufklärung der vorstehend behandelten Genine bleibt noch zu zeigen, daß sie im Ring A am Kohlenstoffatom 3 eine sekundäre Hydroxylgruppe besitzen, wie es in den Formeln angegeben ist.

Windaus, Westphal und Stein[3]) haben das Digitaligenin (Dianhydro-gitoxigenin) durch energische katalytische Hydrierung in ein Gemisch gesättigter Oxy-lactone verwandelt. Dieses Gemisch liefert bei vorsichtiger Chromsäureoxydation ein Gemisch isomerer Ketone. Wenn man aus diesem Gemenge die hoch schmelzenden, schwerer löslichen Anteile, die das Keton des Hexahydro-digitaligenins vom Schmp. 214° (s. S. 180) enthalten, abtrennt, erhält man aus der Mutterlauge eine unscharf zwischen 150° und 185° schmelzende Kristallfraktion. Während das Keton vom Schmp. 214° bei der energischen Oxydation mit Chromsäure in eine Dicarbonsäure vom Schmp. 282° übergeht, liefert der niedrig schmelzende Anteil unter den gleichen Bedingungen eine isomere Dicarbonsäure (19). Bei der Brenzreaktion geht diese Dicarbonsäure (19) unter Abspaltung von Wasser und Kohlendioxyd in ein zyklisches Keton über*). Nun ist bekannt, daß nur Dicarbonsäuren, die durch Aufspaltung von Ring A des Gallensäure-Ringsystems entstehen, in Brenzketone überzugehen vermögen, aber nicht solche Dicarbonsäuren, die durch Aufsprengung von Ring B, C oder D entstehen. Die sekundäre Hydroxylgruppe des Digitaligenins muß also im Ring A ihren Platz haben, und der Abbau kann folgendermaßen formuliert werden:

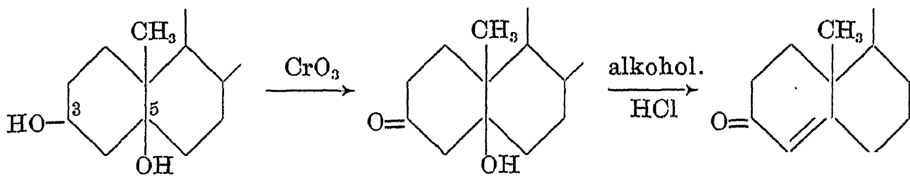


19

Die Annahme, daß die Hydroxylgruppe in Analogie zu den Sterinen am C-Atom 3 steht, wird durch folgende Versuche bewiesen, die Jacobs und Mitarbeiter am Periplogenin durchgeführt haben. Diese Versuche beweisen weiterhin, daß eine der tertiären Hydroxylgruppen des Periplogenins und des Strophanthidins am Kohlenstoffatom 5 haftet.

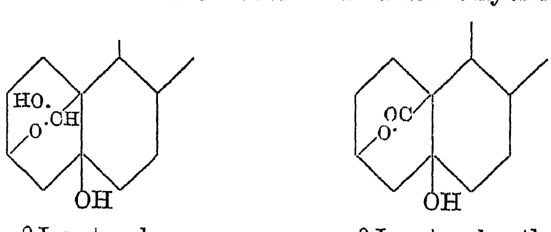
*) Die gleiche Reaktionsfolge konnte auch bei einem Derivat des Uzarigenins verwirklicht werden; die sekundäre Hydroxylgruppe des Anhydro-uzarigenins steht also auch im Ring A; ihre Stellung am C-Atom 3 ist kürzlich von Tschesche[48]) bewiesen worden.

Von den drei Hydroxylgruppen des Periplogenins ist nur eine sekundärer Natur, während die beiden übrigen tertiär gebunden sind. Nach Oxydation des sekundären Hydroxyls zur Ketogruppe (im Iso-periplogonsäuremethylester, s. S. 216), ist eine der tertiären OH-Gruppen labil geworden und kann nunmehr leicht als Wasser abgespalten werden. Hieraus kann man schließen, daß die Ketogruppe und das labile Hydroxyl zueinander in 1,3-Stellung stehen. Da die Ketogruppe im Ring A ihren Platz hat, kommt als einzig mögliche Haftstelle für das tertiäre Hydroxyl nur das Kohlenstoffatom 5 in Betracht, und es folgt hieraus weiterhin, daß das sekundäre Hydroxyl am Kohlenstoffatom 3 steht, wie es bei den Sterinen der Fall ist:



Dieser Schluß gilt auch für Strophanthidin, Digitoxigenin und Gitoxigenin, da sich diese Genine mit Periplogenin unter Erhaltung des sekundären Hydroxyls am C-Atom 3 haben verknüpfen lassen (s. C III d).

Als Haftstelle für die Aldehydgruppe im Strophanthidin ist nur das C-Atom 10 zu diskutieren. Die Aldehydgruppe muß sich in reaktionsfähiger Nähe von der OH-Gruppe am C-Atom 3 befinden, denn es existieren eine Anzahl von Umwandlungsprodukten des Strophanthidins, in denen diese beiden Gruppen einen sauerstoffhaltigen Ring gebildet haben, z. B. ein Lactol bzw. ein Lacton oder auch einen Oxydring:

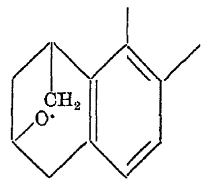


β-Iso-strophanthidsäure [66] β-Iso-strophanthsäure-lacton [66]

Einen Oxydring finden wir in einem sehr interessanten Umwandlungsprodukt des Strophanthidins, dem Trianhydro-strophanthidin. Strophanthidin kann durch Einwirkung von Salzsäure über ein Mono-anhydro- und Dianhydro-strophanthidin[67]) in eine Trianhydro-verbindung[68]) übergeführt werden, die keine acylierbare Hydroxylgruppe mehr

[67]) Jacobs u. Collins, J. biol. Chem. 59, 713 (1924).
[68]) Jacobs u. Collins, J. biol. Chem. 63, 123 (1925).

enthält und in der die Aldehydgruppe des Strophanthidins zur Bildung eines Oxydringes verbraucht ist. Das Trianhydro-strophanthidin enthält vier Doppelbindungen, von denen wahrscheinlich drei einem aromatischen Ring angehören:



Trianhydro-
strophanthidin

Bei der Aromatisierung muß eine Wanderung der Aldehydgruppe stattgefunden haben, wahrscheinlich an das C-Atom 1[69]).

Isomere Dicarbonsäure $C_{23}H_{34}O_6$ (19)[3]): Die leicht lösl. und niedrig schmelzenden Anteile des Gemisches der Hexahydro-digitaligenone werden energisch mit Chromsäure oxydiert. Aus Eg. erhält man eine in feinen Nadeln krist. Dicarbonsäure, die bei 278° schmilzt; $[\alpha]_D^{18} = +71°$ (Eg.); ziemlich leicht lösl. in Eisessig, Alkohol und Aceton, schwer lösl. in Äther. Dimethylester, lange Nadeln aus Methanol, Schmp. 171—172°; $[\alpha]_D^{22} = +40°$ (Chlf.).

Brenzketon $C_{22}H_{32}O_3$: 19 wird aus einer Retorte bei 1 mm und 280° destilliert. Das erstarrte Destillat liefert aus wß. Aceton kleine Nädelchen vom F. 206°; Oxim, F. 248°.

C IV. Zur Physiologie, Testmethoden[70])

Die Herzgifte, vor allem die Digitalis- und Strophanthus-Stoffe, werden zur Bekämpfung der Herzschwäche und bestimmter Unregelmäßigkeiten des Herzschlages angewandt. Sehr kleine Dosen bewirken am kranken Organismus eine Belebung der Herztätigkeit, es kommt zu einer Verstärkung der Herzkontraktionen, ohne daß dabei die Frequenz geändert wird. Diese Wirkung tritt um so auffallender hervor, je schlechter die Herzaktion vorher war. Werden Herzgiftpräparate in zu großen Dosen gegeben, so kommt es in allen Fällen zu einer schweren Herzschädigung, es treten die sogenannten Kumulationserscheinungen auf. Die Folgen der Digitalisintoxikation bestehen ferner in Symptomen seitens des Magen-Darm-Kanals, hauptsächlich Übelkeit und Erbrechen. Ein prinzipieller Unterschied hinsichtlich der physiologischen Wirkung auf das Herz besteht zwischen Digitalis- und Strophanthus-Präparaten nicht.

[69]) Tschesche u. Knick, H. 229, 233 (1934).

[70]) Die Digitalis, Niederländisches Reichsinstitut, J. Springer, Berlin 1923.

Weiterhin wirken die Herzgifte schon in therapeutischen Dosen auf die Blutgefäße, wobei es zu einer ansehnlichen Blutdrucksteigerung kommt. In Bezug auf die Gefäßwirkung scheinen deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Giftstoffen zu bestehen. Das Digitoxin wirkt z. B. verengernd auf die Blutgefäße aller Organe. Im Gegensatz hierzu haben Digitalin und einige Strophanthusglucoside für einzelne Gefäßgebiete verschiedene Wirkung. Neben den Herz- und Gefäß-Wirkungen spielt der Einfluß auf den Vagus eine wesentliche Rolle; therapeutische Dosen bewirken Vagusreizung.

Über die Beziehungen zwischen der chemischen Struktur der Herzgifte und ihrer biologischen Wirkung lassen sich einige Aussagen machen. Die wichtigsten Herzgifte aus der Gruppe der Digitalis- und Strophanthus-Stoffe enthalten als besonderes Strukturelement ihres Geninanteils eine β-γ-ungesättigte Lactonseitenkette, deren Unversehrtheit für die Stärke der pharmakologischen Wirkung von ausschlaggebender Bedeutung ist. In weitaus den meisten Fällen gibt sich das Vorhandensein dieser β-γ-ungesättigten Lactongruppe durch den positiven Legaltest zu erkennen; es besteht also eine weitgehende Parallelität zwischen Wirksamkeit und positiver Legalscher Probe. Durch Absättigung der Lactondoppelbindung mit Wasserstoff erhält man Dihydroderivate, deren physiologische Wirksamkeit außerordentlich herabgemindert ist, und die auch keine Rotfärbung mit Nitroprussid-natrium und Alkali mehr geben. Die Digitaliswirkung des Dihydro-cymarins und des Dihydro-oùabains z.B. beträgt nur noch 5—7% derjenigen der Muttersubstanz. Auch das Dihydro-digitalin ist physiologisch unwirksam (s. S. 178).

Daß pharmakologische Wirksamkeit und positiver Legal-Test nicht immer Hand in Hand zu gehen brauchen, zeigt das Beispiel der Meerzwiebelglycoside: Das Scillaren A und das Scillaren B sind sehr herzaktive Substanzen und liefern keine positive Legalsche Probe; sie besitzen zwar auch eine ungesättigte Lactonseitenkette, die sich aber in ihrem Bau von dem der Lactongruppe in den Digitalis- und Strophanthus-Stoffen unterscheidet.

Wenn auch das Vorhandensein einer ungesättigten Lactongruppe für die Herzwirkung von großer Bedeutung ist, so liegt doch die Digitaliswirkung im Bau des Gesamtmoleküls begründet. Auch den glycosidisch gebundenen Zuckerresten kommt eine erhebliche Bedeutung zu, da sie die Resorbierbarkeit und die Löslichkeit der Genine erhöhen; die Genine selbst sind in Wasser kaum löslich. Im allgemeinen sind die freien Genine nur sehr schlecht herzwirksam, sie sind Krampfgifte. Die typische Herz-

wirkung kommt erst durch die Bindung an Zucker zum Vorschein. Das Digitoxigenin z. B. besitzt nach Cloetta noch starke Herzwirkung, die aber qualitativ und quantitativ von der des Digitoxins abweicht, es ist ein Krampfgift. Anhydro-digitoxigenin ist kein Herzgift mehr, sondern nur Krampfgift.

Obwohl die physiologischen Eigenschaften der Herzgiftglycoside im großen und ganzen dieselben sind, bestehen gewisse Differenzen in ihrem Wirkungscharakter und ganz bestimmte Unterschiede in der Intensität ihrer Wirkung. Das Uzarin z. B. hat bei nur schwacher Herzwirkung einen spezifischen Einfluß auf die glatte Muskulatur. Es ist wahrscheinlich, daß diese Unterschiede von der Zahl und der Stellung der substituierenden Hydroxylgruppen der Genine abhängen und durch die Anzahl und die Natur der Zuckerkomponenten in den einzelnen Glycosiden bedingt sind.

Zur physiologischen Wertbestimmung der Pflanzenextrakte bzw. der kristallisierten Herzgiftpräparate stehen eine Reihe von Testen zur Verfügung. Der bekannteste ist der sogenannte Froschtest von Vocke:

Ein Wasserfrosch wird aufgespannt und das Herz freigelegt. Dann wird in einen Oberschenkellymphsack $^1/_{50}$ des Körpergewichtes der zu untersuchenden Lösung (10-proz.) eingespritzt und die Zeit festgestellt, nach der das Herz in Systole stehen bleibt. Der Valor wird folgendermaßen berechnet: Ist p das Gewicht des Frosches in Gramm, d die Menge der eingespritzten Flüssigkeit, t die Zeitspanne zwischen Injektion und Herzstillstand, dann ist $v = \frac{p}{d \cdot t}$; wird v mit der Verdünnungszahl der injizierten Lösung multipliziert, die erhaltene Zahl durch 1000 dividiert, so erhält man den Valor V.

Diese Methode wird häufig in der Weise abgeändert, daß man die kleinste Dosis bestimmt, die binnen 1, 2, 12 oder 24 Stunden nach Einspritzung des Präparates in den Oberschenkellymphsack das Herz zum systolischen Stillstand bringt. Man kann auch den Zeitfaktor ganz vernachlässigen und einfach die Dosis bestimmen, die die Frösche tötet; es wird hierbei nicht mehr gefordert, daß der Tod durch systolischen Herzstillstand herbeigeführt wird. Bei der Ausführung des Froschtestes ist die verschiedene Empfindlichkeit der Frösche zu beachten. Auch der Einfluß der Temperatur ist bedeutend und muß in Rechnung gesetzt werden. Wird die Zeit als Kriterium verwandt, so spielen auch Unterschiede in der Resorptionsgeschwindigkeit eine große Rolle.

In neuerer Zeit wird der physiologischen Wertbestimmung an Warmblütern der Vorzug gegeben. Eine Methode dieser Art ist die von Hatscher und Brodie: Katzen wird in Äthernarkose bei künstlicher Atmung eine verdünnte Herzgiftlösung zugeführt und die kleinste Dosis bestimmt, die bei langsamer intravenöser Injektion in ungefähr 45 Minuten das Herz zum systolischen oder halbsystolischen Stillstand bringt. Diese Methode gibt sehr befriedigende Resultate. Vor allem wird hierbei die Eichung an dem Herzen von Warmblütern vorgenommen, die dem Menschen näher stehen als der Frosch. Weiterhin schwankt die individuelle Empfindlichkeit der Katzen viel weniger als die der Frösche. Auch der Einfluß der Temperatur, der beim Froschversuch zu beachten ist, fällt hier fort; es brauchen daher nicht jedesmal vergleichende Bestimmungen mit Standardpräparaten vorgenommen zu werden. Unterschiede in der Resorptionsgeschwindigkeit der Präparate spielen keine Rolle, da diese intravenös eingespritzt werden. Bei dieser Art der physiologischen Wertbestimmung darf man nicht vergessen, daß verschiedene Präparate bei Zufuhr per os beim Menschen nicht dieselbe therapeutische Wirkung zu haben brauchen; Zersetzung im Magen-Darm-Kanal und Verschiedenheiten der Resorptionsgeschwindigkeit können ihren Einfluß geltend machen.

C V. Meerzwiebelglycoside: Scillaren A, Proscillaridin A[71])

Aus der Meerzwiebel haben Stoll und Mitarbeiter ein Glycosidgemisch isoliert, das in kristallisierende und amorphe Bestandteile zerlegt werden konnte. Die Isolierung der genuinen herzaktiven Meerzwiebelglycoside gelingt nach einem Verfahren, das sich in den wesentlichen Punkten mit dem bei der Reindarstellung der genuinen Lanataglycoside angegebenen deckt. Aus dem Gemisch der reinen Glycoside läßt sich durch Umkristallisieren aus Methanol-Wasser die schwerlösliche und gut kristallisierende A-Komponente zur Abscheidung bringen, während das sog. Scillaren B als ein amorphes Gemenge verschiedener Glycoside in Lösung bleibt. Die physiologische Wirksamkeit des reinen und einheitlichen Scillarens A beträgt etwa 1000 Frosch-Dosen; das amorphe Scillaren B ist beträchtlich (bis zu 1600 F.D.) wirksamer.

Wie schon eingangs erwähnt worden war, verläuft die Legalprobe bei den Meerzwiebelglycosiden negativ. Dagegen zeigt das Scillaren A wie die Sterine typische rote, blaue und grüne Färbungen bei der Lieber-

[71]) H. 222, 24 (1933); Helv. Ch. A. 17, 641, 1334 (1934); 18, 82, 120, 401 (1935).

mannschen Farbreaktion mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure, während die Aglucone der Digitalis- und Strophanthus-Stoffe unter gleichen Verhältnissen wesentlich schwächere Färbungen geben.

Bei der sauren Hydrolyse zerfällt das Scillaren A in ein Genin, das Scillaridin A und ein neues Disaccharid, die Scillabiose. Diese Biose hat die Formel $C_{12}H_{22}O_{10}$ und setzt sich aus je einem Mol Rhamnose und Glucose zusammen. Für das Aglucon Scillaridin A hatte *Stoll* noch bis vor kurzem eine Formel mit 25 Kohlenstoffatomen bevorzugt. Neuere Untersuchungen haben aber das wichtige Ergebnis gezeitigt, daß das *Scillaridin A ein Derivat der Cholansäure* darstellt und dementsprechend nur 24 Kohlenstoffatome besitzt. Dieser Befund bedeutet eine weitere charakteristische Verschiedenheit der Scilla-Glycoside gegenüber den gut untersuchten Herzgiften, die sich sämtlich von Agluconen mit 23 Kohlenstoffatomen ableiten.

Unter Zugrundelegung dieser neuen Erkenntnis hat das Scillaren A die Formel $C_{36}H_{52}O_{13}$, die sich von der alten Formulierung nur durch den Mindergehalt einer CH_2-Gruppe unterscheidet. Die Hydrolyse des Glycosids verläuft daher nach folgender Gleichung:

$$\underset{\text{Scillaren A}}{C_{36}H_{52}O_{13}} + H_2O = \underset{\text{Scillaridin A}}{C_{24}H_{30}O_3(+H_2O)} + \underset{\text{Scillabiose}}{C_{12}H_{22}O_{10}}$$

Das Scillaren A ist dreifach ungesättigt, während das Scillaridin A vier Doppelbindungen besitzt. Es ist demnach wahrscheinlich, daß das primäre Spaltprodukt ein Genin der Formel $C_{24}H_{32}O_4$ darstellt, aus dem unter den Bedingungen der Hydrolyse sekundär ein Mol Wasser eliminiert wird.

Läßt man auf das Glycosid das in der Meerzwiebel vorhandene Enzym Scillarenase einwirken, so entsteht unter Abspaltung von Glucose ein neues noch zuckerhaltiges Produkt, das Proscillaridin A. Durch Säuren wird das Proscillaridin A schließlich in Scillaridin A und Rhamnose zerlegt. Diese Übergänge lassen sich durch folgende Gleichungen veranschaulichen:

$$\underset{\text{Scillaren A}}{C_{36}H_{52}O_{13}} \xrightarrow{\text{Enzymspaltung}} \underset{\text{Proscillaridin A}}{C_{30}H_{42}O_8} + \underset{\text{Glucose}}{C_6H_{12}O_6}$$

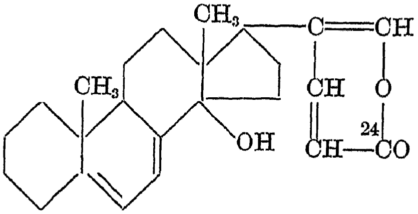
saure Hydrolyse

$$\underset{\text{Scillaridin A}}{C_{24}H_{30}O_3} + \underset{\text{Rhamnose}}{C_6H_{12}O_5}$$

Die Konstitution des Scillaridins A. Wie wir eben gesehen haben, hat das Scillaridin A die Zusammensetzung $C_{24}H_{30}O_3$; es enthält im Molekül vier Doppelbindungen. Von den drei Sauerstoffatomen bilden zwei eine Lactongruppe. Die Aufspaltung dieser Lactongruppe durch alkoholisches Kali vollzieht sich unter gleichzeitiger Veresterung der frei werdenden Carboxylgruppe. Durch Einwirkung von Mineralsäuren auf diesen Ester erfolgt unter Wasseraustritt die Bildung eines Oxydringes ohne Aufhebung einer Doppelbindung; es entsteht der Iso-scillaridin-(A)säure-methylester. Auch hinsichtlich dieser Reaktion zeigt das Scillaridin ein andersartiges Verhalten, als es den meisten Geninen der C_{23}-Reihe zu eigen ist (vgl. Kapitel Isomerisierung). Das dritte Sauerstoffatom liegt als Hydroxylgruppe vor, die sich nicht acylieren läßt. Scillaridin A ist also ein vierfach ungesättigtes Monooxy-lacton.

Unter verschiedenen Bedingungen läßt sich das tertiäre Hydroxyl leicht als Wasser abspalten, wobei das Anhydro-scillaridin A $C_{24}H_{28}O_2$ gebildet wird, das demnach ein fünffach ungesättigtes, hydroxylfreies Lacton darstellt. Bei der katalytischen Hydrierung des Anhydro-scillaridins A entsteht neben dem gesättigten Lacton, dem Dekahydro-anhydro-scillaridin A, unter reduktiver Aufspaltung des Lactonringes die Dekahydro-desoxy-anhydro-scillaridin-(A)säure, die als Scillansäure bezeichnet wird. Die Scillansäure ist nun, wie Stoll, Hofmann und Helfenstein[72]) vor kurzem gefunden haben, identisch mit der Allo-cholansäure. Hierdurch ist in sehr einfacher und übersichtlicher Weise der Aufbau des gesamten Kohlenstoffskeletts des Scillaridins A aufgeklärt.

Auf Grund dieses Ergebnisses und unter Berücksichtigung der übrigen Befunde wird von den genannten Autoren folgende Konstitutionsformel für das Scillaridin A zur Diskussion gestellt:



Scillaridin A

Der Bau des Vierringsystems, die Haftstelle der Lactonseitenkette am Kohlenstoffatom 17 sowie die Lage des Carboxyl-Kohlenstoffatoms (C 24) sind durch die Überführung in Allocholansäure sicher gestellt.

[72]) Helv. Ch. A. 18, 644 (1935).

In dieser Formel ist vor allem noch die Lage der Doppelbindungen im Ringsystem hypothetisch. Die freie OH-Gruppe wird an das C-Atom 14 verlegt, um die Bildung des so äußerst beständigen Oxydrings der Isoverbindungen zu erklären.

Scillaren A $C_{36}H_{52}O_{13}$ (I): Umkristallisieren aus 85proz. Alkohol. Schmp. unscharf bei 270° (korr.); $[\alpha]_D = -73,8°$ (75proz. Alkohol).

Scillaridin A $C_{24}H_{30}O_3$ (II): Aus I durch Hydrolyse mit alkoholischer Salzsäure, derbe Prismen aus absolutem Alkohol, Schmp. zwischen 245—250° (korr.); $[\alpha]_D = -62,7°$ (Chloroform-Methanol, 4:1).

Anhydro-scillaridin A $C_{24}H_{28}O_2$ (III): Aus II durch Hochvakuumsublimation bei 150—160° und 0,01 mm Hg; Prismen aus Chloroform-Methanol, Schmp. 208° (korr.); $[\alpha]_D = -148,5°$ (Chloroform).

α-Scillansäure (Allo-cholansäure): Aus III durch Hydrierung mit Pt u. H_2 in Eisessig. Der saure Anteil des Hydrierungsproduktes liefert aus Eisessig ein Rohprodukt vom Schmp. 165—166°. Diese Roh-Scillansäure wird mit Diazomethan verestert und das Estergemisch aus Methanol fraktioniert kristallisiert. Die schwerstlöslichen Anteile schmelzen schließlich konstant bei 94° und stellen reinen α-Scillansäure-methylester dar (lange Nadeln). Aus den Mutterlaugen erhält man den in feinen Nädelchen kristallisierenden β-Scillansäureester vom Schmp. 72—74°. Durch alkalische Verseifung des α-Esters gelangt man zu der freien α-Scillansäure, die nach Reinigung über das Natriumsalz aus Eisessig umkristallisiert wird. Die reine α-Scillansäure (Allo-cholansäure) bildet lange Prismen vom Schmp. 172—173°; $[\alpha]_D = +22,5°$ (Dioxan).

C VI. Die Krötengifte

Die bisher aufgezählten Herzgifte sind alle pflanzlichen Ursprungs. Es gibt daneben noch eine Gruppe sehr interessanter Stoffe, die tierischen Ursprungs sind und ebenfalls eine starke digitalisähnliche Wirkung auf das Herz entfalten; dies sind die sog. Krötengifte, die in gewissen Hautdrüsen dieser Tiere produziert werden.

Einen weitgehenden Einblick in die Chemie dieser Substanzen verdanken wir hauptsächlich den Arbeiten von Wieland und Mitarbeitern[73]).

Aus Bufo vulgaris wurde zuerst das Bufotalin gewonnen. Bufotalin hat die Zusammensetzung $C_{26}H_{36}O_6$. Von den 6 Sauerstoffatomen dieser Verbindung bilden zwei eine Lactongruppe; drei Sauerstoffatome sind als Hydroxyle vorhanden, von denen eins mit Essigsäure verestert ist. Ferner enthält der Stoff zwei Doppelbindungen. Bufotalin ist also das

[73]) Wieland u. Weil, B. 46, 3315 (1913); Wieland u. Weyland, Sitzungsb. Bayr. Akad. Wiss. 1920, 329; Wieland u. Alles, B. 55, 1789 (1922); Wieland c. s., A. 481, 215 (1930), 493, 272 (1932), 517, 22 (1935); Kotake, A. 465, 1, 11 (1928).

Monoacetyl-derivat eines zweifach ungesättigten Trioxy-lactons der Formel $C_{24}H_{34}O_5$. Von den drei Hydroxylgruppen sind zwei sekundärer und eine tertiärer Natur.

Durch Einwirkung von konz. Salzsäure verliert Bufotalin leicht ein Mol Essigsäure und ein Mol Wasser und geht hierbei in ein vierfach ungesättigtes Monooxy-lacton der Formel $C_{24}H_{30}O_3$ über, das als Bufotalien bezeichnet wird. Bufotalien ist mit Scillaridin A isomer.

Später haben Wieland und Alles aus Bufo vulgaris noch eine neutrale stickstoffhaltige Substanz isoliert, das Bufotoxin. Das Bufotoxin besitzt die Formel $C_{40}H_{62}O_{11}N_4$ und ist kein Glycosid, sondern ein Ester. Der charakteristische Bestandteil, das Genin des Bufotoxins, ist ein einfach ungesättigtes Tetraoxy-lacton $C_{24}H_{36}O_6$; von den vier Hydroxylgruppen sind zwei frei vorhanden, die dritte ist durch Essigsäure, die vierte durch Suberyl-arginin verestert. An Stelle der Zuckerreste, die bei den Herzgiften des Pflanzenreiches als Paarlinge auftreten, finden wir also bei diesem Krötengiftstoff das Suberyl-arginin.

Bei der Hydrolyse mit verd. Säuren werden aus dem Bufotoxin nicht nur die beiden esterartig gebundenen Säuren, sondern auch drei Mol Wasser abgespalten, und an Stelle des erwarteten einfach ungesättigten Lactons $C_{24}H_{36}O_6$ erhält man ein vierfach ungesättigtes Monooxy-lacton $C_{24}H_{30}O_3$. Dieses Spaltprodukt ist identisch mit dem Bufotalien, das auch aus dem Bufotalin durch Behandeln mit konz. Salzsäure entsteht. Die Spaltungsreaktionen lassen sich folgendermaßen formulieren:

$$\underset{\text{Bufotoxin}}{C_{40}H_{62}O_{11}N_4} \xrightarrow{\text{verd. HCl}} \underset{\text{Bufotalien}}{C_{24}H_{30}O_3} + \underset{\text{Suberyl-arginin}}{C_{14}H_{26}O_5N_4} + CH_3COOH + H_2O$$

$$\underset{\text{Bufotalin}}{C_{26}H_{36}O_6} \xrightarrow{\text{konz. HCl}} \underset{\text{Bufotalien}}{C_{24}H_{30}O_3} + CH_3COOH + H_2O$$

Bufotoxin und Bufotalin leiten sich also von demselben Anhydrogenin, dem Bufotalien, ab und stehen sicher in einem genetischen Zusammenhang. Ihre gegenseitige Überführung durch Abspaltung oder Anlagerung von Suberyl-arginin ist in vitro noch nicht gelungen; dieser Übergang wird wohl im lebenden Organismus vor sich gehen.

Durch katalytische Hydrierung erhält man aus dem vierfach ungesättigten Bufotalien ein gesättigtes Oxy-lacton $C_{24}H_{38}O_3$, das Bufotalan. Das Bufotalan muß ein System von vier hydrierten Ringen enthalten genau wie die Gallensäuren, da es wie diese acht Atome Wasser-

stoff weniger enthält als ein gesättigtes Lacton der Paraffinreihe mit 24 Kohlenstoffatomen.

In neuerer Zeit haben Wieland und Vocke aus dem Gift der japanischen Kröte, Bufo japonicus, zwei neue Giftstoffe, das Gamabufogenin und das Gamabufotoxin, isoliert.

Das Gamabufogenin besitzt die Formel $C_{24}H_{34}O_5$; est ist sicher nahe verwandt mit Bufotalin. Beide Verbindungen sind zweifach ungesättigte Trioxy-lactone und besitzen ein tetracyclisches Ringsystem; im Bufotalin ist eine Hydroxylgruppe acetyliert. Man kann vermuten, daß die beiden Stoffe gleiche, aber möglicherweise stereoisomere Kohlenstoffgerüste besitzen und sich nur durch die verschiedene Lage der substituierenden Hydroxylgruppen unterscheiden. Durch Behandeln mit starker Salzsäure spaltet Gamabufogenin ein Mol Wasser ab und geht in Anhydro-gamabufogenin, ein dreifach ungesättigtes Dioxy-lacton der Formel $C_{24}H_{32}O_4$, über.

Das Gamabufotoxin hat die Formel $C_{38}H_{60}O_{10}N_4$ und enthält gleichfalls Suberyl-arginin als esterartig gebundenen Bestandteil. Bei der energischen Hydrolyse liefert das Gamabufotoxin unter Abspaltung von Suberyl-arginin und Wasser dasselbe Anhydro-gamabufogenin, das man auch aus Gamabufogenin erhält.

Läßt man verd. Säuren auf Gamabufotoxin einwirken, so entsteht unter Abspaltung von Suberyl-arginin und Wasser ein isomeres Anhydro-gamabufogenin, das sich aber durch Behandeln mit starker Salzsäure in das zuerst erwähnte Anhydro-produkt umlagern läßt. Die Beziehungen dieser Stoffe lassen sich folgendermaßen darstellen:

$$\underset{\text{Gamabufotoxin}}{C_{38}H_{60}O_{10}N_4} \xrightarrow{\text{verd. HCl}} \underset{\text{isomeres Anhydro-gamabufogenin}}{C_{24}H_{32}O_4} + \underset{\text{Suberyl-arginin}}{C_{14}H_{26}O_5N_4} + H_2O$$

konz. \ HCl   konz. HCl

$$\underset{\text{Gamabufogenin}}{C_{24}H_{34}O_5} \xrightarrow{\text{konz. HCl}} \underset{\text{Anhydro-gamabufogenin}}{C_{24}H_{32}O_4} \qquad (+ H_2O)$$

Die Überführung von Gamabufotoxin und Gamabufogenin in identische Anhydro-genine läßt den genetischen Zusammenhang beider Giftstoffe vermuten.

Von besonderem Interesse ist der nahe Zusammenhang von Krötengiften und Gallensäuren, auf den Wieland als erster eindringlich hin-

gewiesen hat. Es erscheint nach Wieland möglich, daß das Bufotalan $C_{24}H_{38}O_3$ das Lacton einer Dioxy-cholansäure ist, deren eine (tertiäre) Hydroxylgruppe sich in γ-Stellung zur Carboxylgruppe befindet. Es ist Wieland und Mitarbeitern weiter gelungen, das Bufotalien auf Umwegen in eine Monocarbonsäure $C_{24}H_{40}O_2$, also ein Isomeres der Cholansäure zu verwandeln. Diese als Iso-bufo-cholansäure bezeichnete Säure ist mit keiner der bekannten Cholansäuren identisch. Ob diese Säure nur stereoisomer zu der Cholansäure ist und überhaupt dem ursprünglichen sterischen Typus der dem Bufotalin zugehörigen Grundsubstanz entspricht, ist unbekannt.

Für ein anderes Krötengift, das Cinobufagin[74]) $C_{25}H_{32}O_6$ aus Sekreten der chinesischen Kröte Bufo gargarizans, konnte Tschesche[75]) kürzlich die Verwandtschaft mit den Sterinen beweisen. Es gelang, durch Selendehydrierung aus dem Cinobufagenin den Kohlenwasserstoff $C_{18}H_{16}$, das γ-Methyl-cyclo-penteno-phenanthren zu erhalten.

Bufotoxin: Nadeln aus Alkohol, Schmp. 204/05° (u. Z.). Mit Essigsäureanhydrid und konz. Schwefelsäure intensive Farbreaktion. Dihydro-bufotoxin (Schmp. 187°) gibt diese Reaktion nicht mehr.

Bufotalin: Feine Prismen aus Alkohol. Zers. bei 148°.
Bufotalien: Hellgelbe Blättchen aus 75%ig. Alkohol, Schmp. 219° (u. Z.).
Bufotalan: Acetylderivat, Nadeln vom Schmp. 165°
Iso-bufocholansäure: Nadeln vom Schmp. 177°; $[\alpha]_D = +50{,}5°$.
Gamabufotoxin: harte, rundliche Körner, Zers. bei 210°.
Gamabufogenin: Prismen aus Alkohol, Schmp. 254—255° (u. Z.).
Anhydro-gamabufogenin: Schmp. 258—261°.
Isomeres Anhydro-gamabufogenin: Nadeln aus Alkohol, Schmp. 204°
Cinobufagin: Aus Alkohol Kristalle vom Schmp. 223°.

[74]) Jensen u. Chen, J. biol. Chem. 82, 397 (1929), 87, 741 (1930); s. a. [75]).

[75]) Tschesche u. Offe, B. 68, 1998 (1935).

D. Die Keimdrüsenhormone

D. I. Männliche Sexualhormone

D I a. Zur Physiologie der Testikelhormone[1]), Testmethoden

Die Existenz eines männlichen Sexualhormons hatte man schon seit langem vermutet. Bereits im Jahre 1849 ist der Hoden (Testikel) von Berthold als innersekretorische Drüse angesprochen worden. Seine Kastrations- und Transplantationsversuche an Hähnen haben die Lehre von der inneren Sekretion der männlichen Keimdrüse eingeleitet. Aber erst etwa 40 Jahre später, seit der Feststellung der physiologischen Wirkung von Keimdrüsenextrakten durch Brown-Séquard, begann man zu versuchen, das Hormon der männlichen Keimdrüse zu isolieren. Diese Versuche blieben jedoch bis in die neuere Zeit fast ohne Erfolg. Um die Jahrhundertwende finden wir dann eine Fülle von tierexperimentellen Arbeiten, die sich mit der inneren Sekretion des Hodens befassen; fast alle Wirbeltierklassen werden zum Experiment herangezogen. Es sind hier vor allem zu nennen die Arbeiten von Steinach (1894—1913), Pézard (1918/1922), Champy (1913/1922), Courrier (1921), Aron (1924/1926). Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeiten seien kurz zusammengefaßt:

a) Kastriert man infantile männliche Tiere, so bleibt die Ausbildung der Genitalorgane und die der sekundären Geschlechtsmerkmale aus.

b) Kastration eines erwachsenen männlichen Tieres führt zur Atrophie der Genitalorgane, insbesondere der Anhangsdrüsen des Genitaltrakts.

c) Durch Implantation von Hoden vermag man die nach einer Kastration auftretenden Ausfallserscheinungen weitgehend zu beheben.

d) Einen gleichen Erfolg erzielt man auch durch Darreichung von Hodenextrakten.

[1]) Ausführliche Zusammenfassung und Literatur: C. R. Moore, „The Biology of Testis“ und F. C. Koch, „Biochemistry and Assay of Testis Hormones“ in „Sex and Internal Secretions“, herausgegeben von E. Allen. Baltimore 1932, S. 281—391.

Den sicheren Nachweis für das Vorhandensein eines männlichen Sexualhormons durch die Prüfung der physiologischen Wirksamkeit von zellfreien Hodenextrakten erbrachten aber erst die Chikagoer Arbeitskreise um F. C. Koch und C. R. Moore (Mc. Gee, 1927[2]). In unabhängiger Arbeit kamen S. Loewe[3]) und C. Funk[4]) zu gleich wichtigen Ergebnissen; diese Autoren machten ferner die Entdeckung, daß sich männliches Hormon außer im Blut (Martins, 1930[5])) auch im Männerharn nachweisen läßt, in dem es kontinuierlich zur Ausscheidung kommt. Nachdem schließlich Gallagher und Koch[6]), fußend auf den qualitativen Arbeiten von Pézard, im sog. Hahnenkammtest eine spezifische, für quantitative Bestimmungen brauchbare Methode gefunden hatten, war die erfolgreiche stoffliche Bearbeitung der männlichen Sexualhormone möglich geworden.

Das Testikelinkret ist durch folgende charakteristische physiologische Wirkungen ausgezeichnet, die alle zum Nachweis des Hormons dienen können:

a) Bei Fischen und Amphibien werden die äußeren männlichen Geschlechtsmerkmale ausgelöst, z. B. das während der Laichzeit auftretende „Hochzeitskleid" des Bitterlingmännchens. Das Hervorrufen dieses Hochzeitskleides an kastrierten Bitterlingen ist von Glaser und Haempel[7]) als Nachweisreaktion für das männliche Sexualhormon vorgeschlagen worden, doch ist diese Reaktion nicht streng spezifisch.

b) Bei Hähnen[8]) erfolgt die Ausbildung von Kamm- und Bartlappen in Abhängigkeit von der inneren Sekretion der männlichen Keimdrüse. Kastration eines Hahnes führt zum Kapaun, der vor allem durch den kamm- und bartlosen Kopf ausgezeichnet ist.

c) An Nagetieren läßt sich zeigen[9]), daß Lebensdauer und Beweglichkeit der Spermatozoen von der Gegenwart männlichen Hormons abhängen.

---

[2]) Proc. of Inst. of Med. of Chicago 6, 242 (1927).

[3]) Loewe u. Voss, Sitz. Akad. Wiss. Wien, math-naturw. Kl. Oktober 1929; — und Lange u. Wahner, Klin. Wschr. 7, 1376 (1928); — und Rothschild u. Borchardt, Bio. Z. 221, 461 (1930).

[4]) Funk u. Harrow, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 26, 325 (1929); Biochem. J. 24, 1678 (1930); — und Lewja, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 26, 569 (1929); Amer. J. Physiol. 92, 440 (1930).

[5]) Endokrinol. 7, 180 (1930).

[6]) J. biol. Chem. 84, 495 (1929); J. Pharm. u. Exper. Therap. 40, 327 (1930); Proc. Soc. Intern. Congr. for Sex. Res. 1930, 312.

[7]) Endokrinol. 2, H. 2 (1932); Pflügers Arch. 229, 1 (1931).

[8]) Pézard, C. r. Soc. Biol. 97, 1436 (1927).

[9]) Moore u. Mc. Gee. Amer. J. Physiol. 87, 436 (1928).

d) Wachstum und Ausbildung der Samenblasen (Vesikulardrüsen)[10], der Prostata[11], der Cowperschen Drüsen[12], des Penis[13], des Vas deferens[14] und der Präputialdrüsen[15] verlaufen nur unter der vegetativen Wirkung des männlichen Keimdrüseninkretes.

e) Auch die sekretorische Tätigkeit der Anhangsdrüsen des männlichen Genitaltraktes wird vom Testikelinkret kontrolliert; nur in Gegenwart von Testikelhormon sind die Anhangsdrüsen imstande, ein normal koagulierendes Ejakulat zu bilden[16].

Die Frage, ob alle geschilderten physiologischen Merkmale an ein und dieselbe Substanz gebunden sind, oder ob mehrere männliche Sexualhormone im Hoden produziert werden, muß noch offen gelassen werden.

Fast alle diese Eigenschaften sind zur quantitativen Bestimmung des Testikelhormons herangezogen worden; bevorzugt werden der „Vesikulardrüsentest" (Loewe, Moore) und der „Hahnenkammtest" (F. C. Koch).

Der Vesikulardrüsentest definiert als „Einheit" diejenige Substanzmenge, die bei bestimmter Verabreichung die atrophierte Vesikulardrüse kastrierter Mäusemännchen zur mikroskopisch erkennbaren Norm entwickelt, bzw. eine Substanzmenge, die an der Vesikulardrüse infantiler Rattenmännchen einen makroskopisch sichtbaren, eventuell gewichtsmäßig zu ermittelnden Wachstumseffekt hervorbringt.

Für die chemische Erforschung des aus Männerharn isolierten Androsterons ist besonders der Hahnenkammtest verwendet worden, der die Ausbildung männlicher Geschlechtsmerkmale an Hähnen zur Grundlage hat. Seit Pézard kennt man die hormonale Abhängigkeit des Hahnenkammwachstums vom Testis. Gallagher und Koch[6] haben diese Beobachtungen zu einem quantitativen Hahnenkammtest ausgearbeitet. Die an jung kastrierten Hähnen ausbleibende Entwicklung des

[10]) Steinach, Pflügers Arch. 56, 304 (1894); Loewe u. Voss, Klin. Wschr. 9, 461 (1930); Dtsch. med. Wschr. 1930, 30; Arch. exper. Path. 159, 543 (1931); Moore u. Gallagher, Amer. J. Physiol. 89, 388 (1927); Moore, Hughes u. Gallagher, Amer. J. Anat. 45, 109 (1930); Martins, Endokrinol. 7, 180 (1930); Lanz, Pflügers Arch. 222, 181 (1929).

[11]) Steinach, a. a. O.; Moore, Price u. Gallagher, Amer. J. Anat. 45, 71 (1930).

[12]) Heller, Proc. Soc. exper. Biol. and Med. 27, 751 (1930).

[13]) Baker, Brit. J. Exper. Biol. 5, 187 (1928).

[14]) Moore, Vatna u. Gallagher, Anat. Rec. 45, 233 (1930).

[15]) Voss, Z. f. Zellforschung 14, 200 (1931).

[16]) Moore u. Gallagher, Amer. J. Anat. 45, 39 (1930); Kabak, Endokrinol. 9, 250 (1931).

Kammes wird durch subkutane Darreichung von Hormon behoben; die kleinen, blassen Kapaunenkämme werden wieder zur vollen Ausbildung und zum normalen Wachstum gebracht. In einem gewissen Größenbereich wächst der Kamm proportional der verabreichten Dosis. Durch E. Laqueur und Mitarbeiter[17]) und besonders durch Schoeller und Gehrke[18]) ist die Methodik weiter ausgearbeitet worden.

Der Hahnenkammtest definiert als Einheit eine Substanzmenge, die bei Kapaunen nach bestimmter Darreichung einen genau definierten Wachstumseffekt am Hahnenkamm hervorruft. Schoeller und Gehrke definieren als praktische Einheit diejenige Substanzmenge, die je einmal an zwei aufeinander folgenden Tagen verabreicht, am 3. oder 4. Versuchstage ein Flächenwachstum von 20% als Durchschnittswert bei drei Kapaunen hervorbringt.

Die von Butenandt und Tscherning[19]) bevorzugte Technik des Hahnenkammtestes ist im folgenden wiedergegeben:

Hähne der weißen Leghornrasse werden im Alter von 8—10 Wochen nach der Collignonmethode kastriert; durch wiederholtes Ausmessen der Kammfläche wird festgestellt, ob die Kämme der Tiere sich im Verlauf der nächsten 8—10 Wochen auf ein konstantes Maß einstellen; nur diejenigen Kapaune, die dieser Forderung genügen, werden als Versuchstiere vorbereitet. — Sie erhalten zunächst eine Kontrollösung bekannten Hormongehaltes, damit alle Individuen ausgesondert werden können, die nicht der Norm entsprechend reagieren oder deren Kamm sich nach dem Abklingen des Hormonstoßes nicht wieder auf sein Anfangsmaß zurückbildet. Nur ein auf diese Weise sorgfältig ausgewählter Bestand von Versuchstieren gibt die Gewähr für gleichmäßige und zuverlässige Resultate.

Die Tiere werden normal ernährt und in hellen, luftigen Stallungen mit geräumigem Auslauf gehalten; lediglich während der Zeit des eigentlichen Versuches (und wenige Tage vorher) befinden sich die Kapaune in einem vom Tageslicht abgeschlossenen Laufstall, der auf konstanter Temperatur (20°) gehalten und tagsüber gleichmäßig beleuchtet wird.

Die auf ihre Wirksamkeit zu prüfende Substanz wird in Sesamöl aufgenommen; die Konzentration der Lösung wird so gewählt, daß die zu verabreichende Menge in 1 ccm enthalten ist. Man injiziert subcutan unterhalb der Haftstelle der Flügel und verwendet pro Dosis 3 Kapaune von möglichst gleichem Alter und Gewicht, denen je einmal an zwei aufeinander folgenden Tagen 1 ccm der Lösung verabreicht wird.

Als Maß für die Hormonwirkung gilt der Größenzuwachs der Kammfläche, der dadurch ermittelt wird, daß man vor Beginn der Injektionen und am 3. und 4. Versuchstag jeweils zwei photographische Kammschattenbilder aufnimmt, die zweckmäßig so hergestellt werden, daß man innerhalb einer

[17]) de Fremery, Freud, Laqueur, Pflügers Arch. 226, 741 (1930).

[18]) Wien, Arch. inn. Med. 21, 329 (1931).

Celluloidhülle photographisches Gaslichtpapier hinter den Kamm bringt und kurz mit einer Glühlampe belichtet. Die Fläche der Schattenrisse läßt sich leicht mit einem Planimeter ausmessen.

Im fortlaufenden Experiment ist darauf zu achten, daß die Versuchstiere mindestens alle 8 Wochen eine vollwirksame Hormondosis erhalten, da sie sonst die Fähigkeit zu einer normalen Reaktionsweise einbüßen.

D I b. Vorkommen, Isolierung

Männliches Sexualhormon kommt außer in der Keimdrüse und im Urin normaler geschlechtsreifer Männer auch im Blut vor. Es wird in der Keimdrüse erzeugt und von dort aus mit dem Beginn der Geschlechtsreife regelmäßig an die Blutbahn abgegeben. Ein Teil des im Organismus zirkulierenden Hormons wird durch die Nieren ausgeschieden und findet sich dementsprechend im Harn wieder. Butenandt und Tscherning haben aus Männerharn ein männliches Sexualhormon, das Androsteron, isoliert. Die Frage, ob sich dieses Hormon auch in den Testes vorfindet und ob das Androsteron ein primär in den Testes produziertes Hormon darstellt, kann noch nicht beantwortet werden*).

Nach Funk und Harrow kommt das Hormon im Harn in einer ätherlöslichen und einer ätherunlöslichen Form vor, sodaß bei alkalischer Reaktion durch Äther nur ein Teil extrahiert wird. Nach starkem Ansäuern ist auch der Rest durch Äther extrahierbar. Funk nimmt an, daß das Hormon im Harn zum Teil in einer Verbindung vorliegt, die durch Säure hydrolysierbar ist. Von Loewe wurde männliches Hormon im Pflanzenreich nachgewiesen, und zwar in den männlichen Blüten von Weiden und Birken. Es findet sich auch in der Hefe. In 50—75 g Stierhoden, in 300—600 ccm Blut oder in 300—400 ccm Harn ist etwa eine „Hahneneinheit" vorhanden.

Butenandt und Tscherning[19]) haben auf folgende Weise das Androsteron isoliert und rein dargestellt: Als Ausgangsmaterial dient Männerharn, der mit Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion angesäuert und dann konzentriert wird. Dieses Material wird mit Chloroform extrahiert. Die in Chloroform löslichen Anteile umfassen etwa 160 g aus 200 l Harn und stellen eine mit Kristallen durchsetzte, braune, feste Masse dar, die in etwa 150—160 mg 1 K. E. (Kapaun-Einheit) enthält. Durch mehrmaliges Ausschütteln der ätherischen Lösung (peroxydfrei!) des Chloroformextraktes mit 2 n-Kalilauge lassen sich etwa 90—95% an sauren, unwirksamen Bestandteilen entfernen; die ätherische Lösung, die das Hormon enthält, hinterläßt nach dem Eindampfen ein dunkelrotes, dünnflüssiges Öl, das in 8—10 mg 1 K. E. enthält. Dieser neutrale Anteil wird einer Wasserdampfdestillation unterworfen, wodurch sich ein widerwärtig riechendes, fast

*) s. Nachtrag S. 315.

[19]) H. 229, 167 (1934).

farbloses Destillat abtrennen läßt, das bis zu 35% des Gewichtes ausmacht; 6 mg des nicht flüchtigen Anteils enthalten 1 K. E. Zur weiteren Reinigung wird das mit Wasserdampf nicht flüchtige Öl durch zweistündiges Kochen mit 3 n-methylalkoholischer Kalilauge verseift. Nach dem Verdünnen der alkalischen Lösung wird der wirksame Faktor durch erschöpfende Extraktion in Äther übergeführt; die physiologische Wirksamkeit des unverseifbaren Anteils beträgt pro 3—4 mg 1 K. E. Durch anschließendes Erhitzen mit gesättigter methylalkoholischer Salzsäure lassen sich aus dem Nichtverseifbaren durchschnittlich weitere 20% an Verunreinigungen abtrennen. Nach dem Verdünnen der salzsauren Lösung wird der wirksame Anteil wiederum mit Äther ausgeschüttelt; Wirksamkeit pro 2,8—3 mg 1 K. E.

Eine weitere Anreicherung bringt die Anwendung von Entmischungsmethoden mit Lösungsmitteln. 2,8 g Konzentrat (1 K. E. = 2,8—3 mg) werden unter Erwärmen in etwa 5 ccm Benzol zu einer sirupösen Lösung verteilt, die unter kräftigem Schütteln mit 300—400 ccm hochsiedendem Petroläther versetzt wird. Es fällt ein öliger Niederschlag, von dem die klare Lösung abdekantiert wird; mit dem Niederschlage wird der gesamte Vorgang so oft wiederholt, bis die beim Petrolätherzusatz auftretende Fällung flockiges Aussehen bekommt und der Petroläther fast farblos bleibt. Durch diese Operation wird die wirksame Substanz vollständig in die petrolätherische Lösung übergeführt. Die vereinigten Petrolätherauszüge werden nunmehr mit einer Mischung von 70 Teilen Aethylalkohol und 30 Teilen Wasser solange ausgeschüttelt, bis sich die Alkoholphase nicht mehr anfärbt. Hierdurch wird das Hormon dem Petroläther wieder entzogen; nach Eindampfen der vereinigten alkoholischen Lösungen erhält man ein Produkt, das 1 K. E. in 1—1,4 mg enthält.

Aus diesen hochwirksamen „Alkoholchargen“ läßt sich das Hormon durch eine Reihe von Ketonreagenzien leicht in gut kristallisierter Form zur Abscheidung bringen. Das Oxim eignet sich am besten zur Isolierung des Hormons. Die Alkoholchargen (1 K. E. in 1—1,4 mg) werden mit überschüssigem Hydroxylamin in alkoholischer Lösung 5 Stunden gekocht. Dann wird die Lösung im Vakuum zur Trockne verdampft, der Rückstand mit Äther verrieben und die filtrierte ätherische Lösung stehen gelassen. Das Hormon-oxim scheidet sich in schön ausgebildeten Kristallen ab. Nach mehrfachem Umkristallisieren aus verd. Alkohol erhält man das Oxim in prismatischen Nadeln vom Schmp. 215—216°. Das Oxim ist physiologisch aktiv, jedoch wesentlich schwächer als das Hormon selbst und die Wirkung ist charakteristisch verzögert.

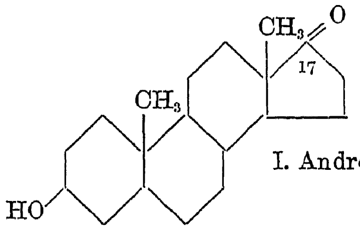
Zur Darstellung der aktiven Ketonkomponente wird das Oxim durch 2stündiges Erhitzen mit alkoholischer Salzsäure gespalten und das Spaltprodukt durch anschließende Hochvakuum-Sublimation (0,0001 mm Hg und 65—85°) und Kristallisation gereinigt. Man kann das Reaktionsprodukt auch sogleich aus verd. Alkohol oder verd. Aceton umkristallisieren. Das reine Hormon, das den Namen Androsteron erhalten hat, kristallisiert in gefiederten Blättchen oder in langen, prismatischen

Nadeln vom Schmp. 178°; es ist leicht löslich in allen organischen Lösungsmitteln, sehr schwer in Wasser; $[\alpha]_D^{20} = +93°$ (Alkohol). Nach der angegebenen Testmethodik liegt die Kapauneneinheit für das reine Androsteron bei 150—200 γ. Bei Anwendung einer protrahierten Auswertungstechnik kommt man mit wesentlich geringeren Stoffmengen aus (Tschopp-Test). Injiziert man z. B. 2mal täglich über 4 Tage, so wird mit 22—25 γ Androsteron als Injektionsdosis (44—50 γ als Tagesdosis) bis zum 5. Versuchstag ein Wachstum des Kammes um etwa 20% in der Fläche erzielt; 18—20 γ pro Injektion (36—40 γ pro Tag) rufen mit dieser Technik bereits ein Kammflächenwachstum um etwa 15% hervor.

D I c. Androsteron (I)

Das Androsteron hat die Formel $C_{19}H_{30}O_2$. Es besitzt gesättigten Charakter. Die vorhandenen beiden Sauerstoffatome sind in Form einer sekundären Hydroxylgruppe und einer Carbonylgruppe vorhanden. Aus dem Wasserstoffgehalt der Formel $C_{19}H_{30}O_2$ geht hervor, daß das Hormon 8 Wasserstoffatome weniger enthält als ein gesättigtes Paraffin mit 19 C-Atomen. Androsteron ist also ein gesättigtes, tetracyclisches Oxyketon[20]).

Butenandt hat auf Grund seiner Hypothese, daß das Androsteron ebenfalls ein Sterinabkömmling sei wie das Follikelhormon, für das Androsteron folgende Konstitutionsformel aufgestellt:



I. Androsteron

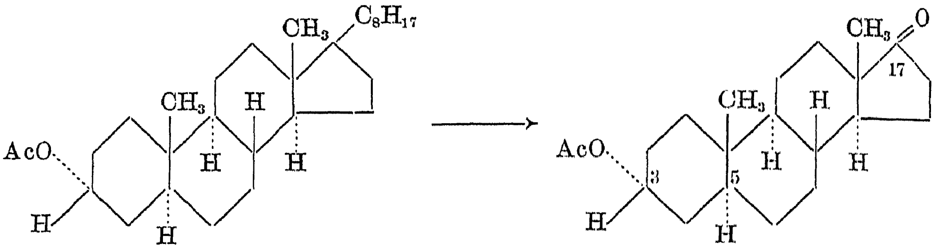
In dieser Formel finden wir das gleiche charakteristische Vierringsystem wieder, das auch den Sterinen, Gallensäuren, Herzgiften und Saponinen zugrunde liegt. Der wesentliche Unterschied gegenüber den Sterinen besteht darin, daß am C-Atom 17 an Stelle der Seitenkette eine Carbonylgruppe vorhanden ist.

Ruzicka und Mitarbeiter[21]) haben die Konstitution des Androsterons durch dessen künstliche Darstellung aus Cholesterin mit einem Schlage vollständig aufgeklärt und hiermit die von Butenandt in den wesentlichen Zügen vorausgesagte Formel bestätigt. Darüber hin-

20) Butenandt u. Tscherning, H. 229, 185 (1934).
21) Helv. Ch. A. 17, 1395 (1934).

aus konnte noch die (relative) sterische Lage von Hydroxyl und Wasserstoffatom an den Kohlenstoffatomen 3 bzw. 5 ermittelt werden.

Die künstliche Darstellung des Androsterons aus einem Cholesterin-Derivat gelang folgendermaßen: Durch energische Chromsäureoxydation des epi-Cholestanol-acetats läßt sich die Seitenkette absprengen und man kann aus dem Reaktionsgemisch in geringer Menge über das Semicarbazon ein neutrales Oxyketon der Formel $C_{19}H_{30}O_2$ isolieren, das in jeder Hinsicht mit dem von Butenandt und Tscherning dargestellten Androsteron identisch ist. Androsteron ist also 3-epi-Oxy-ätio-allocholanon-(17) und der Abbau ist folgendermaßen zu formulieren:



epi-Cholestanol-acetat

Androsteron-acetat, 3-epi-Acetoxy-ätio-allocholanon-(17)

Interessant ist, daß das Androsteron in der räumlichen Anordnung der Hydroxylgruppe nicht dem Cholesterin entspricht. Das Androsteron ist eines der in der Natur vorkommenden Sterinderivate, von denen man sicher weiß, daß sie der epi-Reihe angehören.

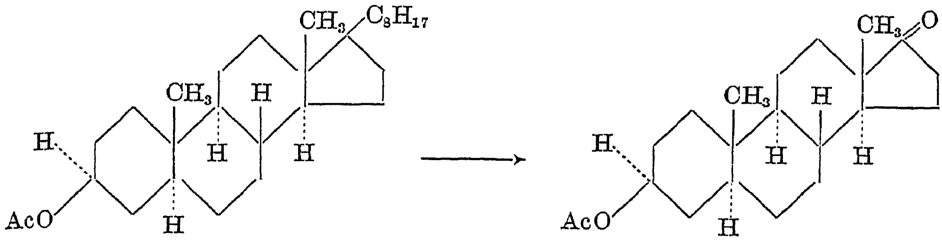
Das Androsteron gibt bei der Oxydation ein Diketon, das Androstandion[20]), das im Kapaunentest noch hoch aktiv ist; die K.E. für das Androstan-dion beträgt etwa 400 γ, d. h. es ist etwa halb so wirksam wie das Androsteron. Das Diketon läßt sich nach der Methode von Clemmensen zu dem gesättigten Grundkohlenwasserstoff, dem Androstan[20]), reduzieren.

D I d. trans-Androsteron (II)[22])[23])

Wenn man Cholestanol-acetat, dessen OH-Gruppe die „normale" trans-Stellung (zu H—C_5) hat, in der gleichen Weise mit Chromsäure abbaut, gelangt man zum 3-Oxy-ätio-allocholanon-(17), das Ruzicka als trans-Androsteron bezeichnet:

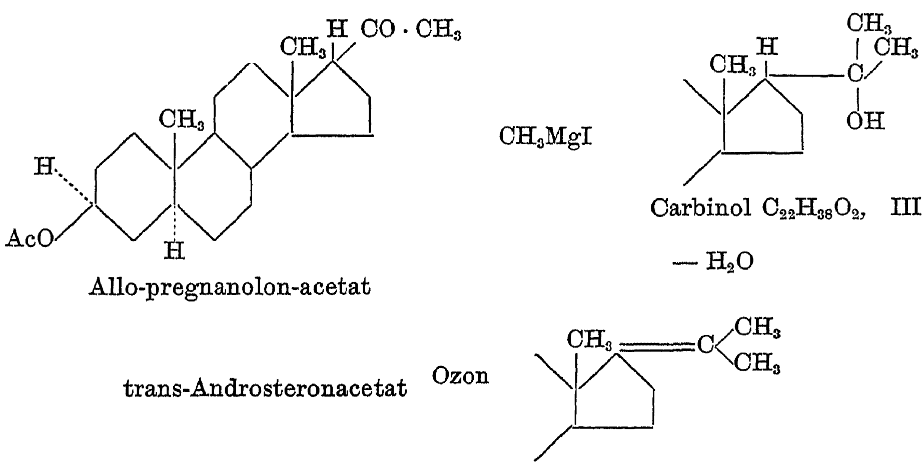
[22]) Ruzicka, Goldberg u. Brüngger, Helv. Ch. A. 17, 1387 (1934).

[23]) Butenandt u. Cobler, H. 234, 218 (1935).



Cholestanol-acetat trans-Androsteron-acetat, 3-Acetoxy-ätio-allocholanon-(17)

Das trans-Androsteron[1]) haben Butenandt und Cobler[23]) auch durch Seitenkettenverkürzung des Allo-Pregnanol-ons erhalten. Das Allo-Pregnanolon (s. S. 272) ist ein im Corpus luteum vorkommendes physiologisch inaktives Sterinderivat, in dem ein Tetrahydroprodukt des Corpus-luteum-Hormons vorliegt. Allo-Pregnanolon-acetat wird durch Umsetzung mit Methyl-magnesiumjodid in das Carbinol $C_{22}H_{38}O_2$ (III) übergeführt. Aus dem Carbinol III läßt sich leicht Wasser abspalten, wobei als Hauptprodukt ein bei 144° schmelzendes Anhydro-Derivat der Formel $C_{22}H_{36}O$ (IV) entsteht. Durch Ozonspaltung dieses ungesättigten Alkohols (IV) kommt man in glatter Reaktion zum Acetat des trans-Androsterons (3-Oxy-ätio-allocholanon-(17)).



Allo-pregnanolon-acetat

Carbinol $C_{22}H_{38}O_2$, III

trans-Androsteronacetat

Anhydro-derivat $C_{22}H_{36}O$, IV

[1]) Das Präfix trans soll bedeuten, daß Hydroxyl an C-3 und Wasserstoff an C-5 auf verschiedenen Seiten des Moleküls stehen (nach Ruzicka). Butenandt [H. 234, 224 (1935)] hat für das trans-Androsteron die Bezeichnung Iso-androsteron verwendet. Der Übersichtlichkeit halber sei hier, solange eine einheitliche Nomenklatur der stereoisomeren Sterinderivate fehlt, dem Vorschlag von Ruzicka der Vorzug gegeben.

Durch vorsichtige Chromsäureoxydation läßt sich das trans-Androsteron in das entsprechende Diketon überführen, das mit dem aus Androsteron erhaltenen Androstan-dion in chemischer und physiologischer Hinsicht völlig identisch ist.

Es ist bemerkenswert, welchen Einfluß die sterische Lage der Hydroxylgruppe auf die physiologische Wirksamkeit besitzt. Während das Androsteron nach der Butenandtschen Testmethode zu 150—200 γ wirksam ist, sind von der trans-Verbindung 1,4 mg notwendig, um das für 1 K.E. geforderte Hahnenkammwachstum hervorzurufen. Eine noch größere Bedeutung für das Zustandekommen der physiologischen Wirkung hat die sterische Anordnung der Substituenten an dem asymmetrischen C-Atom 5. Die aus Koprosterin bzw. Epikoprosterin[21]) dargestellten cis-Dekalin-Derivate, das 3-Oxy-ätio-cholanon-17 und das 3-epi-Oxyätio-cholanon-17, sind physiologisch unwirksam. Da das Allo-Pregnanolon durch Abbau von Stigmasterin zugänglich ist, sind somit das Stigmasterin, das Corpus-luteum-Hormon und das Androsteron genetisch miteinander verknüpft.

D I e. Androstan-diol (V)[24])[25])

Die Reduktion der Ketogruppe des Androsterons führt zum Dihydro-androsteron (Androstan-diol), das interessanterweise in Analogie zur Wirksamkeitssteigerung bei der Umwandlung von Follikelhormon in Dihydro-follikelhormon (s. S. 262) wesentlich höher physiologisch wirksam ist als das Androsteron selbst. Die Reduktion der Ketogruppe des Androsterons läßt sich auf verschiedene Weise durchführen, z. B. durch Behandeln mit Natrium und Propylalkohol oder durch Hydrierung mit Platin und Wasserstoff in saurer Lösung. In beiden Fällen entstehen erwartungsgemäß Stoffgemische, deren Zusammensetzung je nach der Art der angewandten Methodik schwankt; in beiden Fällen wird aber gleicherweise als Hauptprodukt ein Androstan-diol vom Schmp. 221° (223°, korr.) erhalten. Dieses Diol erweist sich im Kapaunentest zu 45—50 γ wirksam (normale Injektionstechnik von Butenandt), ist also 3mal so wirksam wie das Androsteron. Bei protrahierter Injektionstechnik erzielt man mit 10—12 γ pro Dosis (2mal täglich über 4 Tage, 20—24 γ pro Tag) bis zum 5. Tage ein Kammwachstum von 20%. Das Diol entfaltet, genau wie Androsteron, ebenfalls eine Wachstumswirkung auf den Genitalapparat der Nager, insbesondere auf

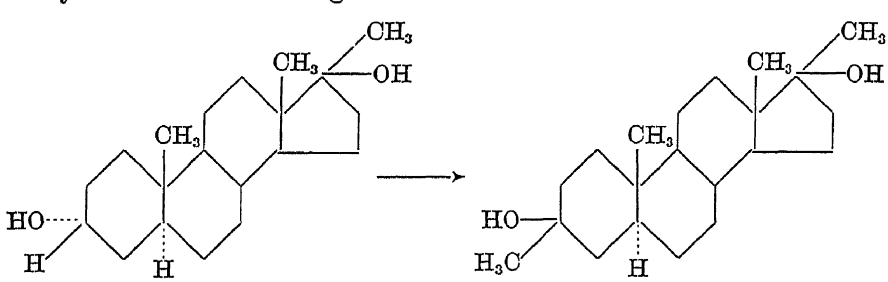
[24]) Butenandt u. Tscherning, H. 234, 224 (1935).
[25]) Ruzicka, Goldberg u. Meyer, Helv. Ch. A. 18, 210 (1935).

die Vesiculardrüse. Es erscheint durchaus möglich, daß das Androsteron das Dehydrierungsprodukt eines im männlichen Organismus primär vorhandenen Dihydro-androsterons darstellt.

Bei der Hydrierung des Androsterons mit Platin und Wasserstoff in saurer Lösung wurde neben dem Androstan-diol vom Schmp. 221° auch ein Gemisch niedriger schmelzender Anteile (Schmp. 202—205°) erhalten, die möglicherweise die stereoisomere Form (C_{17}) des Androstan-diols enthalten. Diese Produkte besitzen die gleiche physiologische Wirkung wie das hochschmelzende Diol. Es scheint also, daß die sterische Bindungsart des Hydroxyls am Kohlenstoffatom 17 ohne wesentlichen Einfluß auf den Grad der Wirkung auf den Kapaunenkamm ist (Ruzicka)[26].

D I f. Methyl-substitutionsprodukte des Androstan-diols

Ruzicka und Mitarbeiter[26]) haben noch einige weitere Umwandlungsprodukte des Androsterons und seines Diketons dargestellt und die neuen Stoffe auf ihre physiologische Wirksamkeit hin untersucht. Durch Umsetzung von Androsteron mit Methyl-magnesiumjodid wurde ein Methyl-androstan-diol dargestellt:



Methyl-androstan-diol, VI   Dimethyl-androstan-diol

Dieses Monomethyl-androstan-diol erwies sich im Kapaunentest als hochwirksam (25 γ, Tschopp-Test).

Durch Behandlung des Androstan-dions mit Methylmagnesiumjodid wurde ein Gemisch von Dimethyl-androstan-diolen erhalten.

Dieses Dimethyl-androstan-diol-Gemisch war bemerkenswerterweise im Gegensatz zum Monomethyl-diol auch in Tagesdosen von 500 γ (Tschopp-Test) nicht deutlich wirksam.

D I g. trans-Dehydro-androsteron (VII)[27])[28])[29])

Neben dem Androsteron haben Butenandt und Dannenbaum[27]) aus Männerharn noch ein Kristallisat von der Formel $C_{19}H_{28}O_2$ abzu-

[26]) Ruzicka, Goldberg u. Meyer, Helv. Ch. A. 18, 994 (1935).
[27]) Butenandt c. s., H. 229, 192 (1934); 237, 57 (1935).

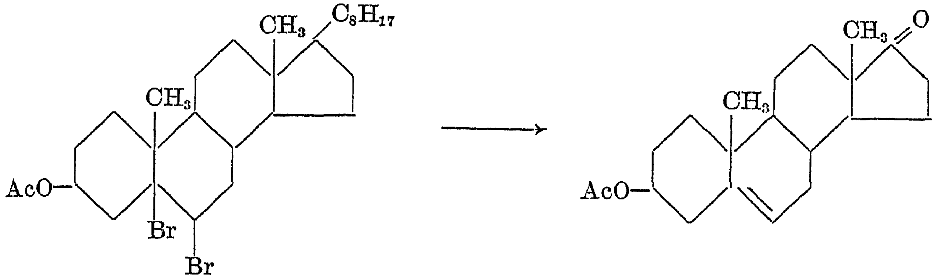
trennen vermocht, das sie als „Dehydro-androsteron" bezeichnet haben. Das „Dehydro-androsteron" $C_{19}H_{28}O_2$ ist ebenfalls ein Oxyketon und besitzt im Gegensatz zu dem gesättigten Androsteron $C_{19}H_{30}O_2$ eine Doppelbindung. Das gleiche ungesättigte Oxyketon $C_{19}H_{28}O_2$ wurde auch ausgehend von einem ungesättigten Chlorketon $C_{19}H_{27}OCl$ erhalten, das ebenfalls bei der Aufarbeitung von Männerharn isoliert wurde. Die Bildung dieses Chlorketons wird so erklärt, daß das im Harn ursprünglich vorhandene „Dehydro-androsteron" während der Aufarbeitung bei der Behandlung mit Salzsäure in das Chlor-Derivat übergeführt wird. Wenn man die in dem ungesättigten Chlorketon vorhandene Doppelbindung zuerst hydriert und in dem Dihydro-Stoff dann das Chloratom durch Erhitzen mit Kaliumacetat gegen Hydroxyl austauscht, gelangt man bemerkenswerterweise zum Androsteron.

Schoeller, Serini und Gehrke[28]) haben dann gefunden, daß der Gehalt des Männerharns an „Dehydro-androsteron" von der gleichen Größenordnung ist wie der an Androsteron. Sie fanden weiter, daß das „Dehydro-androsteron" seiner Konfiguration nach der trans-Form entspricht und demzufolge als trans-Dehydro-androsteron zu bezeichnen ist. Während das Androsteron nicht mit Digitonin fällbar ist, bildet das trans-Dehydro-androsteron mit Digitonin eine schwer lösliche Additionsverbindung. Hierdurch gelingt es leicht, das trans-Dehydro-androsteron aus Gemischen mit Androsteron, wie sie aus Harnkonzentraten erhalten werden, zur Abscheidung zu bringen.

Ruzicka[29]) und Butenandt[27]) haben annähernd gleichzeitig das trans-Dehydro-androsteron durch Seitenkettenabbau von Cholesterin dargestellt und damit seine Konstitution sichergestellt. Als Ausgangsmaterial diente das Cholesteryl-acetat-dibromid, das der Chromsäureoxydation unterworfen wurde; die Bromaddition hat den Zweck, die Doppelbindung des Cholesterylacetats gegen den Angriff des Oxydationsmittels zu schützen. Nach anschließender Entbromung ließ sich aus dem Reaktionsgemisch über das Semicarbazon das $\Delta^{5,6}$-3-Acetoxy-ätio-cholenon-(17) isolieren.

Dieses Acetat ist identisch mit dem natürlichen trans-Dehydro-androsteron-acetat. Durch katalytische Hydrierung läßt es sich in trans-Androsteron überführen. Bei der von Butenandt und Dannenbaum bewerkstelligten Umwandlung des Chlorketons $C_{19}H_{27}OCl$ in das gesättigte Androsteron[27]) muß also eine sterische Umkehrung stattgefunden

[28]) Schoeller, Serini u. Gehrke, Naturw. 21, 337 (1935).
[29]) Ruzicka u. Wettstein, Helv. Ch. A. 18, 986 (1935).



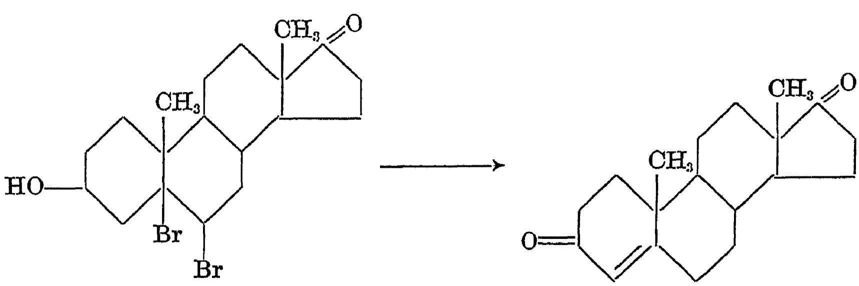
Cholesteryl-acetat-dibromid

trans-Dehydro-androsteron-acetat,
△ ^{5,6}-3-Acetoxy-ätio-cholenon-(17)

haben. Merkwürdigerweise findet eine solche sterische Umkehrung beim Übergang vom ungesättigten Chlorketon in das trans-Dehydro-androsteron nicht statt. Das trans-Dehydro-androsteron ist nach B u t e n a n d t zu etwa 600 γ wirksam, ist also ca. 3mal schwächer aktiv als Androsteron.

D I h. Androsten-dion (VIII)

R u z i c k a[29]) und B u t e n a n d t[30]) haben fast gleichzeitig aus dem trans-Dehydro-androsteron einen neuen, sehr interessanten und hochaktiven Stoff dargestellt, das Androsten-dion. In dem trans-Dehydro-androsteron ließ sich nach Addition von Brom durch vorsichtige Chromsäureoxydation die sekundäre Alkoholgruppe in eine Ketogruppe umwandeln. Nach Entbromung konnte das $\Delta^{4,5}$-Aetio-cholendion-(3,17) isoliert werden.



trans-Dehydro-andro-
steron-dibromid

Androsten-dion,
△ ^{4,5}-Aetio-cholendion-(3,17)

In Analogie zum Cholestenon und zum Corpus-luteum-Hormon wird eine Verlagerung der Doppelbindung in die α-β-Stellung zur Ketogruppe angenommen; dies steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß der Stoff bei 250 mμ eine selektive Lichtabsorption aufweist. Das Androsten-dion stellt ein niederes Homologes des Corpus-luteum-Hormons dar. Es

[30]) B u t e n a n d t, H. 237, 75 (1935).

besitzt am C-Atom 17 an Stelle der $CO \cdot CH_3$-Gruppe des letzteren ein Ring-carbonyl. Trotz dieser konstitutionellen Ähnlichkeit mit dem Corpus-luteum-Hormon besitzt das neue Diketon auch in Dosen von 10 mg keine spezifische Wirkung auf die proliferierte Kaninchen-Uterus-Schleimhaut (Tschopp). Dagegen ist das Androsten-dion im Hahnenkammtest außerordentlich hoch wirksam. Mit einer Wirksamkeit von etwa 100 γ (Tschopp-Test) kommt es der physiologischen Aktivität des Androsterons sehr nahe. Im Vesikulardrüsentest aber entfaltet das Androsten-dion eine wesentlich stärkere Wirkung als das Androsteron (s. auch Nachtrag, S. 315).

Tabelle.
Sterinabkömmlinge vom Typus des Androsterons, die im Hahnenkammtest wirksam sind.

	Test nach Butenandt	Tschopp-Test
Androsteron	150—200 γ	60 γ
trans-Androsteron	1400 γ	500 γ
Androstan-dion	300 γ	100 γ
trans-Dehydro-androsteron	600 γ	150 γ
Androstan-diol	45—50 γ	15—20 γ
Methyl-androstan-diol	—	25 γ
Androsten-dion	200 γ	100 γ

Androsteron (I), Schmp. 178°; $[\alpha]_D^{20} = +93°$ (Alkohol).

Androsteron-acetat, aus I durch Erhitzen mit Essigsäureanhydrid, prismatische Nadeln aus verd. Alkohol, Schmp. 160—161°. Die physiologische Wirksamkeit des Acetats liegt bei etwa 150—170 γ. Analog dem Verhalten der Ester des Follikelhormons zeigt das Androsteron-acetat eine protrahierte, sich über 14 Tage erstreckende Wirkung. Androsteron-propionat, aus I durch zweitägiges Stehenlassen mit Propionsäureanhydrid in Pyridin, Nadeln aus verd. Alkohol, Schmp. 145°. Androsteron-oxim, Schmp. 215—216°. Oxim des Androsteron-acetats, Androsteron-acetat wird nach der für das Androsteron-oxim angegebenen Vorschrift (s. S. 238) mit Hydroxylamin umgesetzt, Nadeln aus verd. Alkohol, Schmp. 219—220°; bei langsamem Erhitzen kann der Schmp. um einige Grade niedriger gefunden werden. Androsteron-semicarbazon, aus I durch fünfstündiges Erhitzen mit Semicarbazid-acetat in alkoholischer Lösung, Nadeln aus abs. Alkohol, Schmp. 276°. Semicarbazon des Androsteron-acetats (s. S. 247), Kristalle aus Alkohol Schmp. 272—273°. Androsteron-benzoat, aus I mit Benzoylchlorid und Pyridin, Kristalle aus Benzol-Benzin und Methanol, Schmp. 178—178,5°. Monobernsteinsäureester des Androsterons, I wird mit Bernsteinsäureanhydrid und Pyridin 9 Stunden auf 80—90° erhitzt. Das Reaktionsprodukt wird in Äther aufgenommen und der saure Ester mit Soda

isoliert, Nädelchen aus Äther-Petroläther, Schmp. 185°; die freie Säure ist, in Öl gelöst, zu 60—80 γ wirksam (Tschopp-Test), das Natriumsalz in wäßriger Lösung zu 80—100 γ.

Darstellung des Androsterons aus epi-Cholestanol. 40 g epi-Cholestanol-acetat werden in 1,7 l Eisessig bei 95° unter Rühren mit einer Lösung von 82 g Chromtrioxyd in 50 ccm Wasser und 250 ccm Eisessig im Laufe von 5 Stunden tropfenweise versetzt. Nach weiterem vierstündigen Erhitzen wird das überschüssige Chromsäureanhydrid durch Methanolzusatz zerstört. Dann wird die Lösung i. V. bei 60° stark eingeengt und der Rückstand nach dem Verdünnen mit Äther ausgezogen. Nach Abtrennung der sauren Bestandteile mittels Lauge läßt sich aus dem neutralen Anteil unverändertes Ausgangsmaterial durch Kristallisation (Stehenlassen in methanolischer Lösung bei 0°) entfernen. Die in der Mutterlauge verbleibenden, öligen, neutralen Produkte werden von flüchtigen Stoffen (Methylheptanon) entweder durch Destillation mit Wasserdampf oder durch Erhitzen i. V. auf 100° befreit. Der nicht flüchtige Rückstand wird mit Semicarbazid-acetat in alkoholischer Lösung erwärmt und das erhaltene rohe Semicarbazon aus Alkohol umkristallisiert; man erhält das Acetat-semicarbazon des 3-epi-Oxy-ätio-allocholanon-(17) vom Schmp. 272—273°. Nach Spaltung des Semicarbazons durch Erhitzen mit Eisessig-Salzsäure oder mit heiß gesättigter Oxalsäurelösung und anschließender alkalischer Verseifung des erhaltenen Acetats bzw. Oxalats gelangt man zum freien Androsteron.

Androstan-dion. Aus I durch Chromsäureoxydation in Eisessig bei Zimmertemp., Blättchen aus verd. Aceton, Schmp. 132—133°.

Androstan. Durch energische Reduktion des Androstan-dions nach Clemmensen. Das mit Äther isolierte Reaktionsprodukt wird bei 0,001 mm Hg und 60—75° sublimiert. Aus verd. Aceton erhält man bei starker Kühlung gefiederte Blättchen, Schmp. 49—50°.

trans-Androsteron (II).

III. Allo-Pregnanolon-acetat wird in abs. Äther mit Methylmagnesiumjodid umgesetzt und das Reaktionsprodukt wie üblich zerlegt. Das in Äther schwer lösliche Carbinol (III) wird aus Alkohol umkristallisiert, Schmp. 182—186°.

IV. III wird erst mit Eisessig und anschließend mit Essigsäureanhydrid erhitzt. Durch mehrfaches Umkristallisieren des Gemisches der Anhydroprodukte aus verd. Alkohol erhält man Kristalle (IV) vom Schmp. 144°.

II. IV wird in Chloroform-Lösung ozonisiert und danach die Oxydationslösung nach Zusatz von Wasser eine halbe Stunde zum Sieden erhitzt. Das trans-Androsteron-acetat erhält man nach Abdampfen des Chloroforms durch Umkristallisieren aus verd. Methanol, Schmp. 96—97°. Durch alkalische Verseifung des Acetats erhält man das Oxyketon II, Kristalle aus verd. Alkohol vom Schmp. 170—171°.

Androstan-diol (V).

1. Durch Hydrierung von I mit Natrium und Propylalkohol. Nach Sublimation des Reduktionsproduktes bei 90—100° und 0,001 mm Hg und Umkristallisieren des Sublimats aus verd. Aceton und verd. Alkohol erhält man Nadeln (V) vom Schmp. 221°; $[\alpha]_D^{23} = +12{,}6°$. Diacetat, Schmp. 159 bis 160°; $[\alpha]_D^{23} = +12{,}5°$.

2. Durch Hydrierung von I mit Platin und Wasserstoff in Eisessig unter Zusatz von 4% konz. Schwefelsäure. Nach alkalischer Verseifung erhält man aus Essigester Kristalle (V) vom Schmp. 223° (korr.).

3-epi-Acetoxy-ätio-allocholanol-(17).

Durch Hydrierung von Androsteron-acetat mit Platin und Wasserstoff in alkoholischer Lösung unter Zusatz von konz. Schwefelsäure, Kristalle aus Methanol vom Schmp. 183° (korr.). Sowohl das Monoacetat als auch das Diacetat von V sind zu 15—20 γ wirksam (Tschopp-Test).

Monobernsteinsäureester von V. Durch katalytische Hydrierung des Androsteron-monobernsteinsäureesters mit Platin und Wasserstoff in Dioxan unter Zusatz von Wasser und etwas Schwefelsäure, Kristalle aus Äther, Schmp. 207—208°; Wirksamkeit (in Öl) 50—60 γ (Tschopp-Test).

Methyl-androstan-diol (VI).

Aus I durch Umsetzung mit Methyl-magnesiumjodid in Äther. Unverändertes Ausgangsmaterial wird als Semicarbazon abgetrennt. Kristalle (VI) aus Essigester Schmp. 184—185°.

trans-Dehydro-Androsteron (VII).

Cholesteryl-acetat-dibromid wird in Eisessig bei 45° mit Chromsäure oxydiert. Das Verfahren ist im wesentlichen dasselbe wie es für die Oxydation des epi-Cholestanol-acetats angegeben ist. Alle Operationen werden bis zur Entbromung unterhalb 50° ausgeführt. Nach Entbromen mit Zink und Eisessig läßt sich aus dem Neutralteil das Semicarbazon des $\Delta^{5,6}$-3-Acetoxy-ätio-cholenons-(17) vom Schmp. 273—275° isolieren, Umkristallisieren aus Chloroform-Alkohol oder Methanol.

Durch Erwärmen mit alkoholischer Schwefelsäure erhält man aus dem Acetat-Semicarbazon das freie Oxyketon (VII), Nadeln vom Schmp. 140—141° (korr.), Blättchen vom Schmp. 152—153° (korr.) aus Hexan oder Äther. Acetat von VII, Kristalle aus Hexan, Schmp. 171—172° (korr.).

Androsten-dion (VIII).

Zu einer Lösung von 200 mg VII in 6 ccm Eisessig wird in der Kälte zuerst tropfenweise eine Lösung von 110 mg Brom in 2 ccm Eisessig und dann eine Lösung von 230 mg Chromsäureanhydrid in 9 ccm 90proz. Essigsäure hinzugefügt. Nach 14stündigem Stehen wird verdünnt und das abgeschiedene Diketon-dibromid durch Erwärmen mit Zink und Eisessig entbromt. Das mit Wasser ausgefällte Produkt wird aus Hexan umkristallisiert, Schmp. 173—174° (korr.).

D II. Weibliche Sexualhormone

D II a. Zur Physiologie der Ovarialhormone, Testmethoden

Für den weiblichen Organismus ist gleichfalls durch Kastrations-, Transplantations- und Implantationsversuche bewiesen worden, daß das Ovarium ein Organ mit innerer Sekretion darstellt (Knauer, Halban, Lippschütz, Steinach, Marschall, Adler, Aschner, Fell-

ner)[1]). Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeiten sind im folgenden kurz zusammengefaßt:

a) Kastration eines infantilen weiblichen Tieres führt zu dauerndem Infantilismus; es unterbleibt die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale.

b) Kastration eines geschlechtsreifen weiblichen Tieres bewirkt Atrophie der Genitalorgane, Aufhören von Brunst- und Menstruationscyclen.

c) Durch Implantation reifer Ovarien sind die hauptsächlichsten Kastrationsatrophien zu beheben.

d) Gleiche Wirkungen erzielt man mit Ovarialextrakten.

Das Wachstum und die Funktion der weiblichen Genitalorgane sowie die Ausbildung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale erfolgt also in Abhängigkeit von einer innersekretorischen Tätigkeit des Ovariums. Diese innersekretorische Tätigkeit des Ovariums, die periodisch vor sich geht, stellt den weiblichen Sexualzyklus dar, in dessen Verlauf zwei Sexualhormone gebildet werden, das Follikelhormon*) und das Corpus-luteum-Hormon.

Während des ersten Teils der rhythmischen Phasenfolge im Ovarium, der Follikelreifung, wird das Follikel- oder Brunsthormon gebildet. Das Follikelhormon vermag an kastrierten weiblichen Nagetieren nach subkutaner Injektion einen einmaligen Brunstzyklus auszulösen (Allen und Doisy). Die Bildung von Follikelhormon dient dem Aufbau — der Proliferation — der Uterusschleimhaut; diese Phase wird daher auch als Proliferationsphase bezeichnet. Der Aufbau der Uterusschleimhaut ist zur Einnistung des befruchteten Eies notwendig und ist ein allgemeines Charakteristikum der Brunst; bei Nagetieren kommt noch ein Aufbau der Scheidenschleimhaut hinzu.

Während der Brunst werden die in der Scheide vorhandenen verhornten Zellen abgestoßen, sodaß man im Scheidensekret brünstiger Nagetiere eine Menge kernloser, scholliger, mit Eosin gut färbbarer Gebilde vorfindet; man nennt dieses Stadium daher auch das Schollenstadium.

---

[1]) Ausführliche Zusammenfassung und Literatur bis 1931: B. Zondek, „Die Hormone des Ovariums und des Hypophysenvorderlappens", Berlin 1931, und A. Butenandt, „Untersuchungen über das weibliche Sexualhormon", Weidmannsche Buchhandlung, Berlin 1931.

*) Unter der Bezeichnung „Follikelhormon" ist eigentlich nur das primär im Ovarium gebildete, die Uterusschleimhaut aufbauende Hormon zu verstehen. Von den verschiedenen bisher isolierten Hormonkristallisaten gebührt wahrscheinlich nur dem Dihydrofollikelhormon vom Schmp. 174° (oder einem seiner Ester) die Bezeichnung „Follikelhormon"; vgl. S. 255.

Wenn die Sexualfunktion ruht — zwischen zwei Brunstphasen — oder fehlt (Kastration), kommt es nicht zum Aufbau der Scheidenschleimhaut. Nunmehr findet man im Scheidensekret im wesentlichen Schleim, vermischt mit Leucozyten und Epithelzellen. Den Aufbau der Scheidenschleimhaut bis zur Abstoßung der verhornten Zellen auszulösen und das Schleimsekret in ein Schollensekret umzuwandeln, ist die Testreaktion, die Allen und Doisy[2]) zur physiologischen Auswertung von Follikelhormonpräparaten ausgearbeitet haben.

Nach der Follikelreifung und dem Follikelsprung wandelt sich der Follikel in den gelben Körper um. Hiermit beginnt die zweite Phase des weiblichen Sexualzyklus. Die schon früher vermutete innersekretorische Leistung des gelben Körpers (Fränkel) ist durch Allen und Corner[3]) bewiesen worden, die aus dem Corpus luteum ein spezifisches Hormon darzustellen vermochten. Außer im Corpus luteum selbst ist das Gelbkörperhormon noch in der Plazenta[4]) nachgewiesen worden. Es unterscheidet sich vom Follikelhormon in biologischer und chemischer Hinsicht. Dem Corpus-luteum-Hormon fällt die Aufgabe zu, die durch das Follikelhormon proliferierte Uterusschleimhaut (Proliferationsphase) in eine funktionierende Schleimhaut, eine Sekretionsschleimhaut, umzuwandeln (Sekretionsphase). Hierauf gründet sich die Nachweisreaktion für dieses zweite weibliche Sexualhormon: Am infantilen Kaninchen wird die proliferierte Uterusschleimhaut durch eine über mehrere Tage verteilte subcutane Verabreichung von 1 Kanincheneinheit Corpus-luteum-Hormon zur vollen Umbildung in eine funktionstüchtige Schleimhaut gebracht.

Hohlweg[5]) führt ähnlich wie Clauberg[6]) den Allen-Corner-Test in der Weise aus, daß er an Stelle der natürlich proliferierten Uterusschleimhaut des geschlechtsreifen Kaninchens ein durch Follikelhormongaben künstlich aufgebautes Endometrium eines infantilen Kaninchens als Indikator der Hormonwirksamkeit verwendet: Infantile Testtiere (2—3 Kaninchen, ca. 750—1000 g schwer) werden 6 Tage lang mit je 25 M.E. Follikelhormon vorbehandelt und sodann nach eintägiger Ruhepause die auf Corpus-luteum-Hormon zu prüfende Substanz in öliger Lösung über 5 Tage verteilt verabreicht. Als Einheit des Corpus-

[2]) J. amer. med. Assoc. 81, 819 (1923).
[3]) Amer. J. Physiol. 88, 340 (1929).
[4]) Adler, de Fremery u. Tausk, Nature 133, 293 (1934).
[5]) Butenandt, Westphal u. Hohlweg, H. 227, 84 (1934).
[6]) Clauberg, Ztrbl. Gynäkol. 1930, Nr. 1; Klin. Wochschr. 9, 2004 (1930). —, Thiel u. Ziecker, Arch. Gynäkol. 152, 61 (1932).

luteum-Hormons (K.E.) wird die Grenzdosis bezeichnet, die (in öliger Lösung an 5 aufeinanderfolgenden Tagen subcutan injiziert) bei sämtlichen Versuchstieren an der Gebärmutterschleimhaut mindestens eine deutlich wahrnehmbare Umwandlung hervorbringt.

Erst durch das Zusammenwirken beider Ovarialhormone wird die weibliche Sexualfunktion vollendet. Beide Hormone sind notwendig, um die Uterusschleimhaut anatomisch und funktionell zur Einnistung des befruchteten Eies vorzubereiten. Das Corpus-luteum-Hormon dient außerdem noch der Erhaltung der Schwangerschaft.

Kaufmann[7]) hat gezeigt, daß am Wachstum und an der Umbildung der Uterusschleimhaut der Frau während eines Menstruationszyklus diese beiden Hormone beteiligt sind, indem er bei operativ kastrierten Frauen durch passend gewählte nacheinander verabfolgte Gaben von Follikel- und Corpus-luteum-Hormon eine echte Menstruation zu erzeugen vermochte: Zur normalen Ausbildung der Uterusschleimhaut wurden innerhalb von 2 Wochen etwa 250000 M.E. Follikelhormon und zur Umwandlung der proliferierten Schleimhaut in eine Sekretionsschleimhaut innerhalb von 8 Tagen etwa 90 Kanincheneinheiten Corpus-luteum-Hormon benötigt.

Gibt man gleichzeitig mit dem Corpus-luteum-Hormon größere Mengen Follikelhormon, so bleibt die Umwandlung der Schleimhaut aus. Das Follikelhormon kann also bei gleichzeitiger Verabreichung das Corpus-luteum-Hormon in der Entfaltung seiner Wirksamkeit hemmen. Bei der Auswertung unreiner Corpus-luteum-Präparate ist es daher notwendig, sich durch eine Prüfung im Allen-Doisy-Test zu überzeugen, daß keine größeren Mengen Follikelhormon zugegen sind.

Allen-Doisy-Test. Butenandt und Ziegner[8]) haben sich bei der Ausführung des Allen-Doisy-Testes folgender Methodik bedient: Zur physiologischen Bestimmung der Brunsthormone benutzt man kastrierte Tiere, bei denen nach Hormonzufuhr die für die Brunstphasen typischen Veränderungen am Scheidensekret beobachtet werden. Man verwendet 10—15 Wochen alte Mäuse (etwa 20 g schwer), die vom Rücken aus kastriert werden; es werden die Ovarien und ein Teil der Uterushörner entfernt. Vom 8. Tage nach der Kastration an werden einmal täglich Kontrollabstriche (mit Platinöse) gemacht. Färbung der Abstriche nach Romanowsky-Giemsa. 3—4 Wochen nach der Kastration wird allen Tieren, die konstant Ruhestadium zeigen, eine Testlösung bekannten Gehaltes injiziert, nicht reagierende Tiere erhalten 14 Tage später eine gleiche Dosis; auf beide Testversuche nicht genügend ansprechende Tiere werden nicht mehr verwendet. Zuverlässig reagierende Tiere werden 6 Wochen nach

[7]) Ztrbl. Gynäkol. **1933**, 42; Klin. Wochschr. 12, 217 (1933).
[8]) H. 188, 1 (1930).

der Kastration in den Versuch genommen. Um den Einfluß der Kastrationsdauer auf die Reaktionsbereitschaft auszuschließen, wird in regelmäßigem Abstand von 14 Tagen möglichst eine wirksame Dosis verabreicht. Die zu untersuchende Substanz wird in alkoholischer Lösung in 50° warmes Sesamöl eingebracht. Man injiziert jedesmal 0,1—0,2 ccm. Scheidenabstriche werden von sämtlichen Tieren einmal täglich, in der Zeit von 36—90 Stunden nach einer Injektion zweimal täglich im Abstand von 12 Stunden genommen. Geprüft wird auf Vollbrunst, das Schollenstadium erscheint bei richtiger Dosierung etwa 40—60 Stunden nach der Injektion. Ein Schollenstadium mit wenigen Epithelzellen wird noch als positiv bezeichnet. Für eine Auswertung werden pro Dosis mindestens 5—6 Tiere verwandt. 75—80% müssen positive Wirkung zeigen. Nach Abklingen der Reaktion kehrt das Versuchstier zum „Ruhestadium" zurück und ist sodann für weitere Versuche brauchbar.

Unter einer Mäuse- oder Ratteneinheit Follikelhormon versteht man z. B. diejenige geringste Substanzmenge, die auf eine oder mehrere Injektionen verteilt den einmaligen vollen Zyklus des Tieres hervorruft. Eine Ratteneinheit ist etwa 4—5mal so groß wie eine Mäuseeinheit.

D II b. Follikelhormone

D II b. 1. Vorkommen von Follikelhormon*). Mit Hilfe des Allen-Doisy-Testes kann Follikelhormon regelmäßig in den Follikeln nachgewiesen werden, nach dem Follikelsprung wird es auch im Corpus luteum des Menschen angetroffen. Es findet sich in der Plazenta der Säugetiere und auch im Genitalapparat fast aller anderen Tiere. Das im Ovarium produzierte Follikelhormon ist im Blut in einer Konzentration bis zu etwa 30 M.E. pro Liter nachweisbar.

Auch im Pflanzenreich hat man Follikelhormon nachweisen können. Butenandt und Jacobi[9]) ist die Darstellung des α-Follikelhormons in reinem kristallisiertem Zustande aus Palmkernpreßrückständen gelungen. Oestruserregende Stoffe sind ferner in Blüten, Kartoffeln, Rüben, Weidenkätzchen, Zuckerrübensamen, Petersilienwurzeln, Kirschen usw. aufgefunden worden! (Loewe, Lange und Spohr[10]); Dohrn, Faure, Poll und Blotevogel[11])). Selbst in einzelligen Lebewesen (Bauer[12]) und Schwertfeger[13]), Glimm und Wadehn[14])) sowie in Bak-

*) Falls nicht besonders angegeben, handelt es sich um Befunde, die an Rohprodukten erzielt worden sind. Man weiß bis jetzt nur in wenigen Fällen, welches der verschiedenen kristallisierten Follikelhormone für die Brunstwirkung des jeweils untersuchten Materials verantwortlich ist.

[9]) H. 218, 104 (1933).

[10]) Bio. Z. 180, 1 (1927).

[11]) Med. Klin. **1926**, 1417.

[12]) Arch. exper. Path. 163, 602 (1931).

[13]) Arch. exper. Path. 163, 487 (1931).

[14]) Bio. Z. 197, 442 (1928).

terienkulturen (Siberstein, Molnar und Engel) ist Hormon nachgewiesen worden. Aschheim und Hohlweg[15]) konnten zeigen, daß auch in Bitumen, Teer, Asphalt, Braunkohle und Torf brunsterregende Stoffe vorhanden sind. Es ist allerdings nicht erwiesen, ob es sich in allen Fällen tatsächlich um Follikelhormon handelt. Cook, Dodds, Hewett[16]) und Lawson[17]) haben eine Reihe von verschiedenen Stoffen synthetisch dargestellt (hauptsächlich Phenanthren- u. Dibenzanthracen-Derivate), die trotz konstitutioneller Verschiedenheit vom Follikelhormon Brunst zu erzeugen vermögen wie das Follikelhormon selbst (allerdings erst in sehr viel größeren Dosen). Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Follikelhormon spielen diese vorgenannten Produkte wegen der geringen Ausbeute keine Rolle.

Eine der Hauptfundstellen der Follikelhormone ist Schwangerenharn (Aschheim-Zondek)[18]). Während der Schwangerschaft findet eine außerordentliche Überproduktion an Hormon statt. Im zirkulierenden Blut ist es jetzt in großer Menge vorhanden, man kann schon durch Injektion von 2 ccm Schwangerenserum die Hormonreaktion an der kastrierten Maus auslösen. Das nicht verwertete Hormon wird während der ganzen Dauer der Schwangerschaft in großen Mengen im Harn ausgeschieden, so daß man pro Liter Harn 100 000—200 000 M.E. Hormon finden kann. Die größten Hormonmengen aber werden im Harn trächtiger Stuten[19]) ausgeschieden, mindestens die 10—100fache Hormonmenge wie im Menschenharn, also 100 000—1 Million M.E. pro Liter. Aus dem von einer Stute während der Trächtigkeit gewonnenen Harn könnte man 30 g kristallisiertes Follikelhormon isolieren. Die Auffindung dieser reichen Hormonquelle ist für die Beschaffung der für die Konstitutionsermittlung notwendigen Hormonmengen von großer Bedeutung gewesen.

Die den Allen-Doisy-Test gebenden Stoffe sind keineswegs auf den Organismus des weiblichen Säugers beschränkt. Sie finden sich auch in den Keimdrüsen und in den Ausscheidungen männlicher Tiere. Die Hoden des Hengstes[20]) sind das follikelhormonreichste Organ, das wir kennen. Der Hengst scheidet im Liter Harn etwa 40 000 M.E. aus, während der Harn des Wallachs merkwürdigerweise nicht mehr Hormon enthält als der Harn nichttragender Stuten. Aus dem hohen Follikel-

[15]) Dtsch. med. Wschr. 59, 12 (1933).
[16]) Naturwiss. **1933**, 287; Nature 131, 56 (1933).
[17]) Proc Roy. Soc., B. 114, 272 (1934).
[18]) Klin. Wschr. 6, 1322 (1927).
[19]) Zondek, Klin. Wschr. 9, 2285 (1930).
[20]) Zondek, Ark. Kemi, Mineral. Geol. (B) 11, 24 (1934).

hormongehalt eines Harns kann also auf Hengst oder hochtragende Stute geschlossen werden. Bemerkenswert ist die Feststellung, daß das Follikelhormon stets in Begleitung des männlichen Hormons vorkommt und umgekehrt.

Kristallisierte Follikelhormone. Es sind im Laufe der Zeit eine Reihe von Hormonkristallisaten aus natürlich vorkommendem Material isoliert worden: α-Follikelhormon sowohl aus Schwangerenharn[21])[22]), als auch aus Harn trächtiger Stuten[23])[24]) und aus Palmkernpreßrückständen[9]), Follikelhormonhydrat aus Schwangerenharn[25]) und aus Plazenta[26]), Dihydro-follikelhormone aus Harn trächtiger Stuten[27]) und aus Ovarien von Schweinen[28]), Equilin, Hippulin und Equilenin aus Harn trächtiger Stuten[24]). Diese verschiedenen Stoffe der Follikelhormongruppe stehen einander in chemischer Beziehung sehr nahe und sind durch ihre gemeinsame Wirksamkeit im Brunsttest an der kastrierten Maus gekennzeichnet. In biologischer Hinsicht unterscheiden sich die verschiedenen Kristallisate hauptsächlich durch den Grad ihrer physiologischen Wirksamkeit:

Tabelle der kristallisierten Follikelhormone.

Substanz	Formel	Schmp.	Opt. Dreh.	Physiol. Wirksamk. M.E. pro g
α-Follikelhormon	$C_{18}H_{22}O_2$	255°	= + 156°	8 000 000
Follikelhormonhydrat	$C_{18}H_{24}O_3$	280°	= + 30°	75 000
Dihydro-follikelhormon	$C_{18}H_{24}O_2$	174°		30 000 000
Dihydro-follikelhormon	$C_{18}H_{24}O_2$	209°	= + 46°	25 000 000
Equilin	$C_{18}H_{20}O_2$	238—240°	= + 308°	1 500 000
Hippulin	$C_{18}H_{20}O_2$	233°	= + 128°	1 500 000
Equilenin	$C_{18}H_{18}O_2$	258—259°	= + 87°	4—700 000

[21]) Doisy, Veler u. Thayer, J. biol. Chem. 86, 499; 87, 358 (1930).
[22]) Butenandt, H. 191, 127 (1930).
[23]) Dingemause, de Jongh, Kober u. Laqueur, Dtsch. M. Ws. **1930,** 301; Bio. Z. 240, 247 (1931).
[24]) Girard, Sandulesco, Fridenson, Rutgers u. Gaudefroy, C. R. **194,** 909, 1020; **195,** 981 (1932). Girard, Sandulesco u. Fridenson, C. R. 112, 964 (1933).
[25]) Marrian, Biochem. J. **23,** 1090, 1233 (1929); **24,** 435, 1021 (1930).
[26]) Collip, Browne u. Thomson, J. biol. Chem. 97, 17 (1932); Endocrin. 15, 315 (1931); Proc. biol. Chem. 26, 17 (1932).
[27]) Wintersteiner, Schwenk u. Whitman, Proc. Soc. exper. Biol. Med. **1935,** 32, 1087.
[28]) Doisy, Mac Corquodale, Thayer, Weekly Bull. of the St. Louis Medical Society; Vol. XXIX, Nr. 28, 22, III. 1935.

Von diesen Hormon-Kristallisaten sind bisher nur das Dihydrofollikelhormon vom Schmp. 174° und das Follikelhormonhydrat in Organen — Ovarien bzw. Plazenten — aufgefunden worden, während die übrigen Brunststoffe nur aus Harn isoliert werden konnten. Das Dihydrofollikelhormon vom Schmp. 174°, das etwa 6mal wirksamer ist als das α-Follikelhormon, war schon von Schwenk und Hildebrandt[29]) durch Reduktion des Follikelhormons dargestellt worden, lange bevor man sein Vorkommen im Organismus nachweisen konnte. Schwenk und Hildebrandt hatten schon seinerzeit die Möglichkeit diskutiert, daß das Dihydro-follikelhormon oder seine Ester, die sich ebenfalls durch eine protrahierte Wirkung auszeichnen, die ursprünglich im Ovar gebildeten Keimdrüsenhormone darstellen, und daß die aus dem Harn zu gewinnenden Brunsthormone α-Follikelhormon, Equilin, Hippulin und Equilenin erst im Verlaufe einer Umwandlung (Dehydrierung) im Organismus aus Dihydro-follikelhormon entstehen. Über die physiologische Bedeutung des Follikelhormonhydrats ist man noch nicht sicher unterrichtet.

DIIb. 2. α-Follikelhormon und Follikelhormonhydrat. Der erste und auch chemisch sowie historisch wichtigste Vertreter der Follikelhormongruppe, das α-Follikelhormon, wurde annähernd gleichzeitig von E. A. Doisy[21]) und A. Butenandt[22]) isoliert. Das α-Follikelhormon besitzt die Formel $C_{18}H_{22}O_2$. Die beiden Sauerstoffatome sind als phenolische Hydroxylgruppe und als Ketogruppe vorhanden. Das Hormon enthält 3 schwer hydrierbare Doppelbindungen, die einen aromatischen Ring bilden.

Marrian[25]) isolierte aus Schwangerenharn einen weiteren im Allen-Doisy-Test wirksamen Brunststoff, das sogenannte Follikelhormonhydrat. Dieses besitzt die Formel $C_{18}H_{24}O_3$ und enthält neben einer phenolischen Hydroxylgruppe zwei alkoholische Hydroxyle.

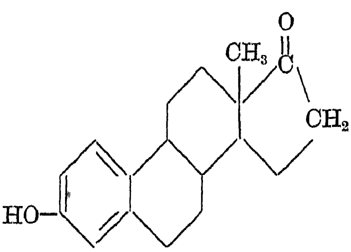
Butenandt und Hildebrandt[30]) ist es in einfacher Weise gelungen, durch Wasserabspaltung aus dem Follikelhormonhydrat mittels Kaliumbisulfat zum α-Follikelhormon zu gelangen*). Das Hormonhydrat unterscheidet sich vom α-Follikelhormon also nur dadurch, daß

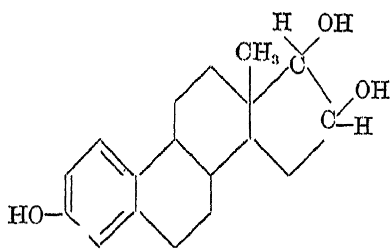
*) Butenandt und Störmer [H. 208, 129 (1932)] glaubten bei der Wasserabspaltung aus dem Follikelhormonhydrat neben dem α-Follikelhormon einen isomeren Stoff, das sogenannte β-Follikelhormon gefunden zu haben. Die Existenz des β-Follikelhormons ist aber seither zweifelhaft geworden.

29) Naturwiss. 21, 177 (1933).

30) H. 199, 243 (1931).

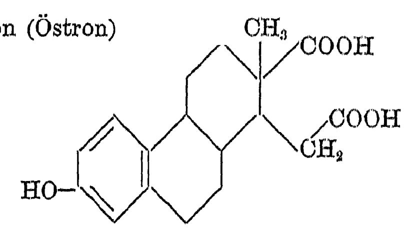
es an Stelle der Ketogruppe des letzteren zwei Hydroxyle besitzt. Diese beiden sekundären Alkoholgruppen stehen an benachbarten C-Atomen, denn durch Alkalischmelze läßt sich aus dem Hormonhydrat, wie Marrian[31]) und Doisy[32]) gefunden haben, unter Aufsprengung der Glykolgruppe eine Phenoldicarbonsäure gewinnen. Da die Phenol-dicarbonsäure bei der Brenzreaktion kein Keton, sondern ein Anhydrid bildet, müssen sich die beiden alkoholischen Hydroxyle des Hormonhydrats und somit auch die Ketogruppe des Hormons in einem 5-Ring befinden. Butenandt und Marrian haben diese Übergänge folgendermaßen formuliert und hiermit schon die vermuteten nahen Beziehungen des Follikelhormons zu den Sterinen zum Ausdruck gebracht.





↓ II. Follikelhormonhydrat

I. α-Follikelhormon (Östron)



III. Phenol-dicarbonsäure aus Follikelhormonhydrat

Der Sättigungsgrad des Hormons ließ sich durch Hydrierungsversuche ermitteln. Durch energische katalytische Hydrierung wurden aus dem α-Follikelhormon ein Hexahydro-desoxo-follikelhormon $C_{18}H_{29}OH$ und aus dem Follikelhormonhydrat ein Hexahydro-follikelhormonhydrat $C_{18}H_{28}(OH)_3$ und zwei isomere Hexahydro-desoxy-follikelhormonhydrate $C_{18}H_{28}(OH)_2$ dargestellt. Im Gegensatz zum Ausgangsmaterial zeigen diese Hydrierungsprodukte in ihrem chemischen Verhalten einen gesättigten und gleichzeitig neutralen Charakter. Die hiermit im Hormon-

[31]) Marrian u. Haslewood, Biochem. J. 26, 25, 1227 (1932); J. Soc. Chem. Ind. 51, 277 (1932).

[32]) Doisy, Mac Corquodale u. Thayer, J. biol. Chem. 99, 327 (1933).

molekül nachgewiesenen 3 Doppelbindungen bilden einen aromatischen Ring und bedingen die saure Natur der an diesem Ring haftenden Hydroxylgruppe. Im α-Follikelhormon liegt also ein 3fach ungesättigtes Oxyketon, in seinem Hydrat ein 3fach ungesättigtes Triol vor. Das dem Hormon zugrunde liegende Vierringsystem besteht aus einem Benzolring und drei gesättigten Ringen; dem gesättigten Grundkohlenwasserstoff kommt die Zusammensetzung $C_{18}H_{30}$ zu.

Ein Gemisch isomerer Hexahydro-dihydro-follikelhormone der Zusammensetzung $C_{18}H_{28}(OH)_2$ wurde von Schoeller, Schwenk und Hildebrandt[33]) dargestellt. Dieses Produkt ist in physiologischer Hinsicht sehr interessant, da es sich im Hahnenkammtest als sehr wirksam erweist. Durch katalytische Hydrierung eines weiblichen Sexualhormons ist man also zu Stoffen gekommen, die gleich den männlichen Sexualhormonen das Hahnenkammwachstum anregen.

Darstellung von α-Follikelhormon[22]) und Follikelhormonhydrat[34]) nach Butenandt. Als Ausgangsmaterial dient Schwangerenharn, der zur besseren Haltbarkeit mit wenig Chloroform versetzt wird; er enthält im Durchschnitt 5—10 M.E. pro Kubikzentimeter an Hormon. Aus diesem Material werden die Follikelhormone mit Äther, Chloroform oder anderen organischen Lösungsmitteln extrahiert. Dem Extrakt lassen sich durch vorsichtige Behandlung mit Alkali unwirksame saure Bestandteile entziehen; nach dem Verdampfen des Lösungsmittels erhält man ein Rohöl von ungefähr 30000 M.E. pro Gramm. Die weitere Verarbeitung des Rohöls ergibt sich aus der folgenden Übersichtstafel (S. 258).

Eigenschaften des α-Follikelhormons[35]). α-Follikelhormon kristallisiert aus Essigester und Alkohol-Wasser entweder in kleinen, rhombischen Blättchen oder in monoklinen, langen Kristallen von perlmutterähnlichem Glanz; Schmp. 255°; $[\alpha]_D = +156°$; im Hochvakuum bei 0,002 mm zwischen 150—200° unzersetzt destillierbar. Es ist ziemlich leicht löslich in Alkohol, Aceton, Chloroform, Benzol, etwas schwerer in Essigester und Äther, sehr schwer in Petroläther, in Wasser ist es nur zu 0,0015% löslich; leicht löslich in Alkalien, besonders in der Wärme, unlöslich in Alkalicarbonaten. Kristallisiertes Hormon ist gegen Sauerstoff empfindlich; in alkoholischer Lösung nimmt die Wirksamkeit in 2 Monaten um mindestens $^1/_3$ ab; in verschlossenen Gefäßen ist es lange Zeit unverändert haltbar. Die Liebermann-Burchard-

[33]) Naturwiss. 21, 286 (1933).
[34]) Butenandt u. Hildebrandt, H. 199, 243 (1931).
[35]) Butenandt, H. 191, 140 (1930).

Übersichtstabelle zur Aufarbeitung von Schwangerenharnextrakten

Schwangerenharn-Rohextrakt
(Hormoncharge I)
30000 M.E. pro g

Trennung zwischen 50%igem CH_3OH
und Petroläther

→ Petrolätherphase

Alkoholphase

↓ + Wasser, ausgeäthert

Hormoncharge II
(100—200000 M.E. pro g)

Trennung zwischen 60%igem Alkohol
und Benzol

Benzolphase	Alkoholphase
Hormoncharge III	**Hormonhydratcharge I**
(300—500000 M.E. pro g)	(Wirksamkeit wechselnd)
↓ Behandlung mit verd. HCl, ausgeäthert	Behandlung mit verd. HCl, ausgeäthert
Ätherische Lösung, Ausschütteln mit Na_2CO_3	Ätherische Lösung, Ausschütteln mit Na_2CO_3

Carbonat-lösliche Anteile ← Ätherische Restlösung, Ausschütteln mit NaOH

Ätherische Restlösung, Ausschütteln mit NaOH ←→ Carbonat-lösliche Anteile

Alkalische Lösung, angesäuert, ausgeäthert: **Hormoncharge IV** (1,5—2 Mill. M.E. pro g) ← Alkaliunlösliche Neutralbestandteile (Pregnandiol)

Alkalische Lösung, angesäuert, ausgeäthert: **Hormonhydratcharge II** ←→ Alkaliunlösliche Neutralbestandteile

frakt. Dest. im Hochvakuum

Verreiben mit Alkohol, Fällen mit Äther

Kristallisiertes α-Follikelhormon
Schmp. 255°
8—9 Mill. M.E. pro g
← Dest. über $KHSO_4$

Kristallisiertes Hormonhydrat
Schmp. 280°
75000 M.E. pro g

sche Reaktion auf Sterine ist negativ. Mit Eisenchlorid entsteht keine Färbung.

Derivate. Oxim. Durch zweistündiges Erhitzen des Hormons mit überschüssigem Hydroxylaminacetat in Alkohol. Nadeln aus verd. Alkohol, Zers. 232—233°. Die physiologische Wirksamkeit ist gegenüber der des Hormons geschwächt.

Acetat. Durch zweitägiges Stehenlassen des Hormons in Pyridin mit Essigsäureanhydrid bei 0°. Aus verd. Alkohol feine Nadeln oder Blättchen, oder spindelförmige Prismen, Schmp. 126°. Physiologisch wirksam wie das Hormon.

Benzoat[36]). Mit Benzoylchlorid und Alkali, lange prismatische Nadeln aus abs. Alkohol, Schmp. 217,5°. Das Benzoat hat eine erhöhte und protrahierte Wirkung: 10—12 Mill. M. E. pro Gramm.

Semibarbazon[37]). Mit Semicarbazidacetat in 50proz. Alkohol, Kristalle aus Alkohol, Schmp. 257—258°. Physiologisch unwirksam.

Methyläther. Mit Dimethylsulfat und Alkali, Kristalle aus Alkohol, Schmp. 168,5—169°. Physiologisch unwirksam. Von Diazomethan wird das Hormon nur schwer methyliert.

Semicarbazon des Hormonmethyläthers. Aus dem Methyläther mit Semicarbazidacetat in alkoholisch-wäßriger Lösung, Kristalle aus Alkohol, Schmp. 267° (Zers.).

Desoxo-follikelhormon $C_{18}H_{23}OH$ (IV)[37])[38]). Durch Erhitzen von Hormonsemicarbazon mit alkoholischer Natriumäthylatlösung 20 Stunden im Bombenrohr auf 180—200°. Beim Ansäuern fällt das Desoxoprodukt aus. Kristalle aus verd. Alkohol, Schmp. 134°, $[\alpha]_D = +89°$ (Alkohol); löslich in Alkali.

Methyläther des Desoxohormons, mit Dimethylsulfat und Alkali, Kristalle aus verd. Alkohol, Schmp. 76,5°.

Hexahydro-desoxo-follikelhormon $C_{18}H_{29}OH$[38]). Durch katalytische Hydrierung des Desoxo-hormons in alkoholischer Lösung mit Platinoxyd. Die ätherische Lösung des Reduktionsproduktes wird mit verd. wäßrigem Alkali ausgeschüttelt und der Ätherrückstand anschließend im Hochvakuum destilliert. Nach Umkristallisieren aus verd. Alkohol und Hochvakuumsublimation erhält man Kristalle vom Schmp. 110°.

Isomere Hexahydro-desoxy-follikelhormone $C_{18}H_{28}O$[38]). Hexahydro-desoxy-hormonhydrat vom Schmp. 153° (s. S. 261) und Iso-hexahydro-desoxy-hormonhydrat vom Schmp. 162° (s. S. 261) werden im Hochvakuum mit Kaliumbisulfat allmählich auf 200° erhitzt. Die Destillate werden mit Semicarbazid umgesetzt. Das Semicarbazon des Hexahydro-desoxy-follikelhormons kristallisiert aus abs. Alkohol, Schmp. 262,5°. Das Semicarbazon des Iso-hexahydro-desoxy-follikelhormons kristallisiert gleichfalls aus abs. Alkohol, Schmp. 278,5°.

Molekülverbindung mit Chinolin[38]). α-Follikelhormon wird mit Chinolin unter Erwärmen auf dem Wasserbade gelöst; die nach dem

[36]) Butenandt u. Störmer, H. 208, 129 (1932).
[37]) Butenandt, Störmer u. Westphal, H. 208, 149 (1932).
[38]) Butenandt u. Westphal, H. 223, 147 (1934).

Abkühlen ausgefallenen farblosen Kristalle werden aus Chinolin umkristallisiert, Schmp. unscharf. Durch Behandlung der ätherischen Lösung der Molekülverbindung mit verd. Salzsäure erhält man leicht reines α-Follikelhormon zurück.

Physiologische Eigenschaften des α-Follikelhormons

Das α-Follikelhormon enthält bei einmaliger Injektion 8—9 Mill. M.E. pro Gramm; d. h. 0,125 γ lösen bei einmaliger Injektion in Öllösung an 80% der Versuchstiere die Vollbrunstreaktion aus[8]. Bei protrahierter Injektionstechnik kommt man mit wesentlich geringeren Stoffmengen aus. Verteilt man z. B. 6 Injektionen über 48 Stunden (in Anlehnung an E. Laqueur[39]) und E. C. Dodds[40]), so vermag man die wirksame Dosis bei Prüfung auf Vollbrunst bis auf 0,0286 γ herabzusetzen; dies entspricht einem Wirkungswert von 35 Mill. M.E. pro Gramm α-Follikelhormon.

Im Tierreich erzeugt es Brunst. Durch eine einmalige Zufuhr von Hormon wird eine einmalige Brunst hervorgerufen, Dauerzufuhr bewirkt Dauerbrunst.

Es bewirkt die Proliferation der Uterusschleimhaut und steigert das Wachstum des Uterus. Die Brustdrüse wird zur Funktion angeregt; hierdurch ist der Einfluß des Hormons auf die sekundären Geschlechtsmerkmale erwiesen. Senile Tiere können zu neuem Sexualleben erweckt werden. Das Hormon, das auch im männlichen Organismus gefunden wird, wirkt antimaskulin, so daß die Hoden im Wachstum zurückbleiben.

Im Pflanzenreich vermag es nach den Arbeiten von Schoeller und Goebel[41]) die Blüten- und Fruchtbildung anzuregen und zu beschleunigen; die Versuche wurden an Hyazinthen, Calla, Maiglöckchen, Mais, Tomate usw. ausgeführt. Diese Befunde sind im Zusammenhang mit dem Vorkommen des α-Follikelhormons im Pflanzenreich besonders interessant.

Eigenschaften des Follikelhormonhydrats[30]). Das Hormonhydrat kristallisiert aus Alkohol, Essigester, am besten aus Alkohol-Essigester, Schmp. 280°; $[\alpha]_D = +30°$. Es ist ziemlich leicht löslich in Alkohol, Aceton, Pyridin, weniger in Äther, schwer in Petroläther. In Wasser ist es zu 0,003% löslich, unlöslich in Sodalösung. Das Hormonhydrat hat stärker sauren Charakter als das α-Follikelhormon; es ist leicht löslich in kaltem Alkali und kann im Gegensatz zum α-Fol-

[39]) J. of Pharmacology 36, 1 (1929).
[40]) Biochem. J. 22, 1526 (1928).
[41]) Bio. Z. 240, 1 (1931); 251, 223 (1932); 278, 298 (1935).

likelhormon aus der alkalischen Lösung nicht mit Äther ausgeschüttelt werden. Mit Diazomethan bildet es — ebenfalls im Gegensatz zum α-Follikelhormon — leicht einen Monomethyläther. Es läßt sich im Hochvakuum bei 0,03 mm und 160—200° unzersetzt sublimieren.

Die verschieden starke Wirksamkeit von Hormonhydratkristallisaten ist auf Mischkristallbildung mit α-Follikelhormon zurückzuführen. Reines Hormonhydrat gewinnt man nach Butenandt aus den Rohkristallisaten durch Umsatz mit Semicarbazid; nach 8tägigem Stehen kann vom ausgefallenen Hormon-Semicarbazon abgetrennt werden.

Derivate. Methyläther. Aus dem Hormonhydrat mit Diazomethan Schmp. 159—160°, $[\alpha]_D = +32°$ (Pyridin).

Triacetat, Schmp. 126°. Die Wirksamkeit beträgt 750 000, ist also 10mal so stark wie diejenige des freien Hormonhydrats, wenn man in öliger Lösung einmal injiziert.

Hexahydro-follikelhormon-hydrat $C_{18}H_{27}(OH)_3$ (V)[37][38]. Hormonhydrat wird in alkoholischer Lösung mit Platinoxyd hydriert. Aus der ätherischen Lösung des Hydrierungsproduktes kristallisiert V, Umkristallisieren aus verd. Alkohol, Schmp. 255—256°.

Hexahydro-desoxy-follikelhormon-hydrat $C_{18}H_{28}(OH)_2$ (VI)[38]. Die in der ätherischen Mutterlauge verbleibenden Anteile werden acetyliert und das Acetatgemisch anschließend im Hochvakuum bei 55° sublimiert. Aus dem Sublimat erhält man nach Umkristallisieren aus verd. Alkohol, Methanol, Dioxan, nochmaligem Sublimieren und Umkristallisieren das Diacetat von VI, Schmp. 84°; $[\alpha]_D = -37{,}6°$ (Alkohol).

Durch alkalische Verseifung dieses Diacetates erhält man aus verd. Alkohol das freie Diol (VI) vom Schmp. 153°.

Iso-Hexahydro-desoxy-follikelhormon-hydrat $C_{18}H_{28}(OH)_2$ (VI a)[38]. Der bei der Hochvakuum-Sublimation des rohen Hexahydro-acetatgemisches (vgl. oben) in der Retorte verbliebene Rückstand wird aus verd. Alkohol umkristallisiert; man erhält das Diacetat von VI a, Schmp. 131°, und hieraus durch Verseifung das freie Iso-Diol (VI a), Kristalle aus verd. Alkohol, Schmp. 162°.

Phenoldicarbonsäure $C_{18}H_{22}O_5$ (III)[32]. Aus Follikelhormonhydrat (II) durch einstündiges Erhitzen mit Ätzkali auf 275°; Reinigung über das in abs. Alkohol schwer lösliche Kaliumsalz; die Säure kristallisiert aus verd. Alkohol in weißen Platten, die 1 Mol Kristallwasser enthalten; Schmp. (wasserfrei) 210—211° (korr.). Die Dicarbonsäure ist interessanterweise physiologisch hochwirksam.

Methoxy-dicarbonsäure (III a)[32]. Aus III durch Behandeln mit Dimethylsulfat und Alkali; Kristalle aus verd. Methanol, Schmp. 200 bis 201° (korr.).

Methoxy-dicarbonsäureanhydrid[32]. Aus III a durch Erhitzen mit Essigsäureanhydrid und anschließender Destillation bei 250° und 0,018 mm Hg, Nadeln aus Eisessig-Essigsäureanhydrid, Schmp. 179° (korr.).

D II b. 3. Dihydro-follikelhormone. Dihydro-follikelhormone werden dargestellt, indem man die Ketogruppe des α-Follikelhormons zu

einer sekundären Alkoholgruppe reduziert[29]). Aus dem Gemisch der hierbei erhaltenen Reduktionsprodukte ließen sich zwei isomere Dihydro-follikelhormone vom Schmp. 174° bzw. 198—204° isolieren. Das Dihydroprodukt vom Schmp. 174°, das unabhängig auch von Girard dargestellt worden war, besitzt bei subcutaner Verabreichung in wäßriger Lösung und sechsmaliger Unterteilung einen physiologischen Wirkungswert von 30 Millionen M.E. pro Gramm und das Isomere vom Schmp. 198—204° unter den gleichen Bedingungen einen solchen von 20—25 Mill., während das α-Follikelhormon bei dieser Auswertungstechnik nur mit etwa 5 Mill. M.E. pro Gramm die Brunsterscheinungen auszulösen vermag (Auswertung an der Ratte).

Erst sehr viel später gelang es, Dihydro-follikelhormone aus natürlichem Material zu gewinnen. Aus Harn trächtiger Stuten[27]) und aus Schweine-Ovarien[28]) konnte das gleiche Dihydro-follikelhormon vom Schmp. 174° isoliert werden, das durch Reduktion des α-Follikelhormons erhalten worden war (vgl. S. 255).

Das Dihydro-follikelhormon vom Schmp. 174° ist im Harn trächtiger Stuten nur in kleinen Mengen vorhanden. Als Hauptprodukt wurde aus diesem Material ein isomeres Dihydro-follikelhormon vom Schmp. 209° isoliert[27]), das sich als identisch erwies mit dem sog. δ-Follikelhormon. Das δ-Follikelhormon war von Schwenk und Hildebrandt[42]) schon 1932 in Harn aufgefunden worden, galt aber bis zu diesem Zeitpunkt als Isomeres des α-Follikelhormons. Während es seinerzeit nicht gelang, ein Keto-Derivat dieses Stoffs zu bereiten, konnte jetzt das Vorhandensein von zwei Hydroxylgruppen durch Bildung eines Di-p-nitrobenzoats bewiesen werden.

D IIb. 4. Equilin, Hippulin und Equilenin[24]). Equilin und Hippulin sind von Girard und Mitarbeitern aus den Mutterlaugen der α-Follikelhormondarstellung aus Stutenharn gewonnen worden. Beide Stoffe besitzen die Formel $C_{18}H_{20}O_2$ und sind Oxy-ketone wie das α-Follikelhormon; sie unterscheiden sich von letzterem dadurch, daß sie eine Doppelbindung mehr besitzen.

Equilin kristallisiert in farblosen Blättchen oder rhombischen Kristallen, Schmp. 238—240°; $[\alpha]_D = +308°$ (Dioxan). Es ist in allen Lösungsmitteln etwas leichter löslich als das α-Follikelhormon und sublimiert im Hochvakuum bei 170—200°. Seine physiologische Aktivität beträgt nur etwa $^1/_7$ derjenigen des α-Follikelhormons.

Oxim, prismatische Nadeln aus verd. Alkohol, Schmp. 221—223° (korr.); Semicarbazon, Nadeln aus Pyridin, Schmp. 265—267°, wenig löslich in

[42]) Naturwiss. 20, 658 (1932).

Alkohol, Benzoat, rechteckige Tafeln aus Alkohol, Schmp. 197—198° (korr.)

Das Hippulin ist dem Equilin sehr ähnlich; beide Stoffe sind isomer und unterscheiden sich wahrscheinlich untereinander nur durch die verschiedene Lage der vierten Doppelbindung. Hippulin besitzt eine schwächere Drehung und eine leichtere Löslichkeit in Alkohol als Equilin, Schmp. 233° (korr.); $[\alpha]_D = +128°$ (Dioxan). Es lagert weniger leicht Brom an als Equilin. Die östrogene Wirksamkeit ist gleich der des Equilins.

Das Equilenin ist der 3. Vertreter dieser im Stutenharn vorkommenden Gruppe wasserstoffärmerer Follikelhormone. Es ist ebenfalls ein Oxy-keton und hat die Zusammensetzung $C_{18}H_{18}O_2$, besitzt also 4 Wasserstoffatome weniger als das α-Follikelhormon. Sämtliche Doppelbindungen bilden zusammen ein Naphthalinsystem. Das Equilenin hat stärker saure Eigenschaften als die anderen Follikelhormone und kann von diesen durch Ausnutzung seiner stärkeren Acidität getrennt werden; weiterhin besitzt es eine merklich größere Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln. Ein Liter Alkohol löst bei 18° 6,3 g und in der Siedehitze 25 g Equilenin. Equilenin liefert ein schwerlösliches Pikrat, wodurch es sich sehr bequem vom α-Follikelhormon abtrennen läßt. Colorimetrisch kann man Equilenin dadurch nachweisen und bestimmen, daß es sich beim Erhitzen auf 255° rot färbt; α-Follikelhormon zeigt diese Rotfärbung beim Erhitzen nicht. Girard weist auf die sehr interessante Tatsache hin, daß im Stutenharn während des Verlaufes der Trächtigkeit zuerst das α-Follikelhormon, dann das Equilin und schließlich das Equilenin in steigenden Mengen auftritt. Dirschel und Hanusch[43]) ist es gelungen, durch Dehydrierung von Equilin mittels Palladium in Stickstoffatmosphäre zum Equilenin zu kommen. Im Harn schwangerer Frauen ist Equilenin nicht nachweisbar. Die physiologische Wirksamkeit des Equilenins beträgt nur etwa den 12.—20. Teil des α-Follikelhormons.

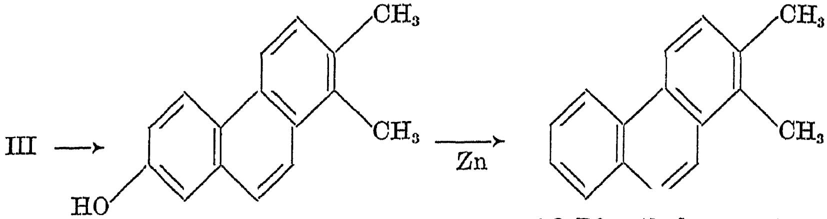
Es kristallisiert aus Alkohol in feinen Nadeln, Schmp. 258—259°, $[\alpha]_D = +87°$ (Dioxan). Oxim, Nadeln aus verd. Alkohol, Schmp. 249—250° (korr.); Benzoat, Schmp. 222—223° (korr.); Acetat, Schmp. 156—157°; Monobromderivat $C_{18}H_{17}O_2Br$, Schmp. 225—227° (Zers.).

DIIb. 5. Die Konstitution der Follikelhormone

Einen ersten, experimentell gesicherten Einblick in die Konstitution des α-Follikelhormons brachte eine Arbeit von Butenandt, Weid-

[43]) H. 233, 13 (1935); 236, 131 (1935).

lich und Thompson[44]). Die Autoren erhielten aus der Phenol-dicarbonsäure, die aus dem Follikelhormonhydrat durch Alkalischmelze entsteht, bei der Selendehydrierung Oxy-dimethyl-phenanthren und aus letzterem durch Zinkstaub-Destillation das 1,2-Dimethyl-phenanthren.



1,2-Dimethyl-penanthren

Hierdurch wurde bewiesen, daß das Follikelhormon drei Ringe in Form eines teilweise hydrierten Phenanthrengerüstes besitzt, an das ein weiterer Ring (5-Ring) angegliedert sein muß.

Einen weiteren Fortschritt hinsichtlich der Konstitutionsaufklärung des α-Follikelhormons und auch des Equilenins brachten Versuche von Cohen, Cook, Hewett und Girard[45]), die die Stellung der phenolischen Hydroxylgruppe ermittelten und gleichzeitig den endgültigen Beweis für den Bau des Ringsystems lieferten.

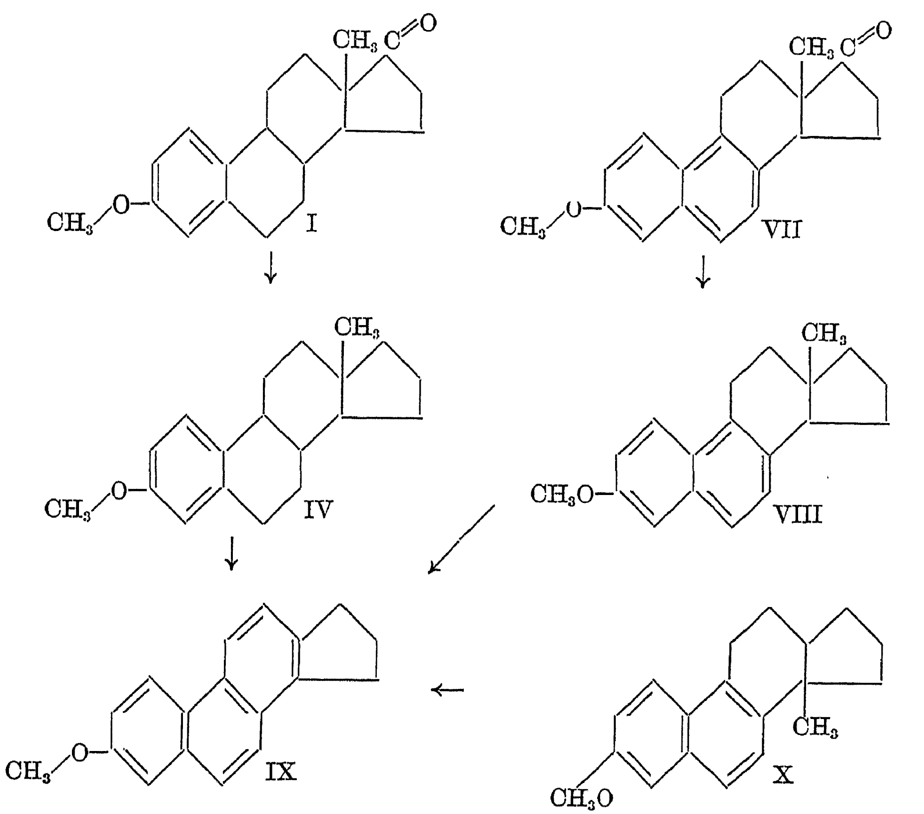
α-Follikelhormon wurde methyliert (I), dann die Ketogruppe in eine CH_2-Gruppe verwandelt und die Desoxo-verbindung (IV) schließlich mit Selen dehydriert. Hierbei wurde ein Stoff erhalten, der sich als einwandfrei identisch erwies mit dem 7-Methoxy-1,2-cyclopenteno-phenanthren (IX), das durch Synthese dargestellt werden konnte.

Der Methyläther des Equilenins (VII) wurde nach der gleichen Methode in eine Desoxo-verbindung (VIII) übergeführt, die ebenfalls zu demselben 7-Methoxy-1,2-cyclopenteno-phenanthren (IX) dehydriert werden konnte.

Diese Ergebnisse bringen den schlüssigen Beweis dafür, daß das Ringsystem des α-Follikelhormons und des Equilenins den gleichen Bau besitzt wie das der Sterine und daß die Hydroxylgruppe an derselben Stelle des Ringsystems steht wie die im Cholesterin.

Daraus, daß sich die phenolische Hydroxylgruppe des α-Follikelhormons im Ring A befindet, ergibt sich, daß Ring A im α-Follikelhormon aromatisch ist, und da das Equilenin ein Naphthalin-Ringsystem besitzt (Formel, Spektrum, Pikrat), muß der zweite aromatische Ring des Equilenins Ring B sein.

[44]) B. 66, 601 (1932).
[45]) J. chem. Soc. 1934, 653.

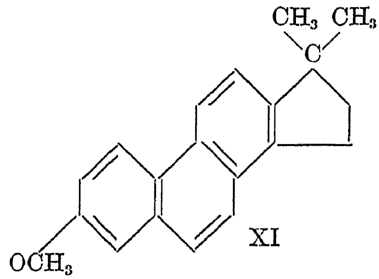


Der Methyläther X, dessen freier Alkohol stark östrogen wirksam ist, wurde im Verlauf der Synthese des 7-Methoxy-1,2-cyclopenteno-phenanthrens dargestellt und erwies sich als verschieden vom Methyläther des (isomeren) Desoxo-equilenins VIII. Diese Verschiedenheit ist für die Stellung der quartären Methylgruppe am C_{13} im Equilenin wegen der cis- und trans-Isomeriemöglichkeiten nicht beweisend.

Die Stellung der Ketogruppe im Fünfring und die der quartären Methylgruppe (C_{13} oder C_{14}), die letzten noch zweifelhaften Punkte des Konstitutionsproblems, wurden endgültig durch folgende Versuche ermittelt[46]).

Der Methyläther des α-Follikelhormons (I) wurde mit Methylmagnesiumjodid umgesetzt und aus dem entstandenen Carbinol Wasser abgespalten. Nach Hydrierung der hierbei gebildeten Doppelbindung

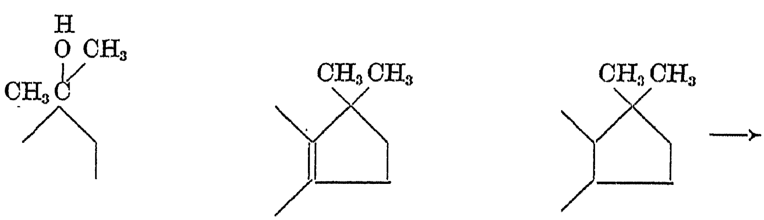
[46]) Cohen, Cook u. Hewett, J. chem. Soc. 1935, 445.



XI

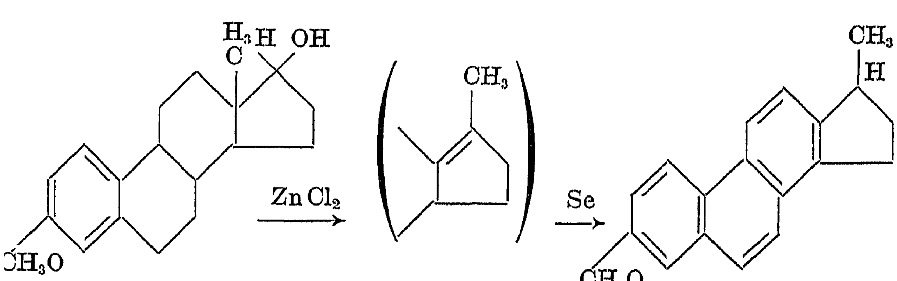
wurde die gesättigte Verbindung schließlich mit Selen dehydriert. Hierbei erhielt man das 7-Methoxy-3',3'-dimethyl-1,2-cyclopenteno-phenanthren (XI), das mit dem synthetisch bereiteten Produkt dieser Konstitution identisch war.

Die gleiche Reaktionsfolge wurde mit dem gleichen Ergebnis (Bildung von XI) auch mit dem Methyläther des Equilins und des Equilenins (VII) durchgeführt. Im Falle des Equilenins konnten sämtliche Zwischenprodukte (XII, XIII, XIV) isoliert werden:



XII XIII XIV

Ferner wurde noch aus dem Methyläther des Dihydro-follikelhormons Wasser abgespalten und das wieder unter Methylwanderung gebildete Anhydro-produkt mit Selen dehydriert. In diesem Falle entstand das 7-Methoxy-3'-Methyl-1,2-cyclopenteno-phenanthren (XV), das sich ebenfalls mit dem synthetischen Präparat als identisch erwies.



Dihydro-follikelhormon XV

Die Wasserabspaltung verläuft also in sämtlichen Versuchsreihen unter gleichzeitiger Wanderung der quartären Methylgruppe an das be-

nachbarte Kohlenstoffatom (C_{17}) des Fünfringes. Die Methylgruppe, die in den Endprodukten in der 3'- oder γ-Stellung erscheint (Nomenklatur der aromatischen Cyclopenteno-phenanthren-derivate), muß vorher am Kohlenstoffatom 13 gesessen haben, womit ihre Stellung bewiesen ist. Bei der Bildung von 7-Methoxy-1,2-cyclopenteno-phenanthren aus den Desoxo-derivaten (IV—IX, VIII—IX) durch Selendehydrierung wird die quartäre Methylgruppe abgespalten. Schließlich folgt aus den Ergebnissen, daß die Ketogruppe dieser Hormone am C-Atom 17 ihren Platz hat, an demselben Kohlenstoffatom also, an dem die Seitenkette der Sterine angreift. Hiermit ist die Konstitution des α-Follikelhormons und seines „Hydrats" sowie ferner die des Equilenins und des Equilins restlos aufgeklärt und ihr naher struktureller Zusammenhang untereinander und mit den Sterinen erwiesen. Beim Equilin ist nur noch die Lage der vierten Doppelbindung unbestimmt. Die Auffassung des Hippulins als Isomeres des Equilins (in Bezug auf die Lage der vierten Doppelbindung) hat außerordentliche Wahrscheinlichkeit, ist indessen noch nicht bewiesen worden.

Equilenin-methyläther (VII)[45]), Nadeln aus Alkohol, Schmp. 195,5—197,5°.

Desoxo-equilenin-methyläther (VIII)[45]), durch Kishner-Wolff-Reduktion des Semicarbazons von VII, Nadeln aus Methanol, Schmp. 121—122°; Pikrat Schmp. 128—129°.

7-Methoxy-1,2-cyclopenteno-phenanthren (IX)[45]), durch Selendehydrierung von IV und VIII, Blättchen aus Alkohol, Schmp. 136—137°; Pikrat Schmp. 136,5—137,5°.

Methylcarbinol XII[46]), aus VII durch Umsatz mit Methyl-magnesium-jodid, seidige Nadeln aus Cyclohexan, Schmp. 133—133,5°.

Anhydro-produkt XIII[46]), aus XII durch einstündiges Erhitzen mit Kaliumbisulfat auf 160—170°, Blättchen aus Alkohol, Schmp. 131—132°.

Dihydro-derivat XIV[46]), aus XIII durch Hydrierung mit Palladium und Wasserstoff in feuchtem Äther, Platten aus Alkohol, Schmp. 131 bis 132°.

7-Methoxy-3,'3'-dimethyl-1,2-cyclopenteno-phenanthren (XI)[46]), aus XIV durch Erhitzen mit Selen auf 300—310°, farblose Platten aus Alkohol oder Nadeln aus Benzol, Schmp. 166—167°.

Equilin-methyläther[46]), Nadeln aus Alkohol, Schmp. 160,5 bis 161,5°.

Methylcarbinol des Equilin-methyläthers[46]), aus Equilin-methyläther durch Umsatz mit Methyl-magnesiumjodid, Nadeln aus Benzol-Petroläther, Schmp. 133—134°.

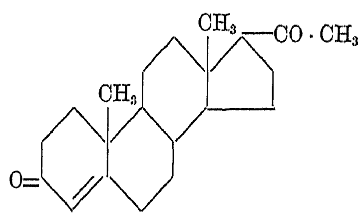
7-Methoxy-3'-methyl-1,2-cyclopenteno-phenanthren (XV)[46]), Dihydro-follikelhormon-methyläther wird mit Zinkchlorid erhitzt und das gebildete Anhydro-produkt mit Selen dehydriert, farblose Blättchen aus Alkohol, Schmp. 147,5—148,5°.

D II c. Das Corpus-luteum-Hormon (Progesteron)

Das Corpus-luteum-Hormon wurde aus Gelbkörperextrakten annähernd gleichzeitig von vier Arbeitsgruppen isoliert[47]) [48]) [49]) [50]).

Das Hormon kristallisiert in zwei polymorphen Modifikationen vom Schmp. 128,5° und 121—122°, die beide dieselbe physiologische Aktivität besitzen.

Das Progesteron konnte als ein einfach ungesättigtes Diketon der Formel $C_{21}H_{30}O_2$ charakterisiert werden; es besitzt ein selektives Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 250 mμ, wodurch angezeigt wird, daß sich die Doppelbindung in α-β-Stellung zu einer der Ketogruppen befindet. Folgende Konstitutionsformel, die als Arbeitshypothese aufgestellt worden war, konnte durch die künstliche Darstellung des reinen Hormons in allen Einzelheiten bestätigt werden:



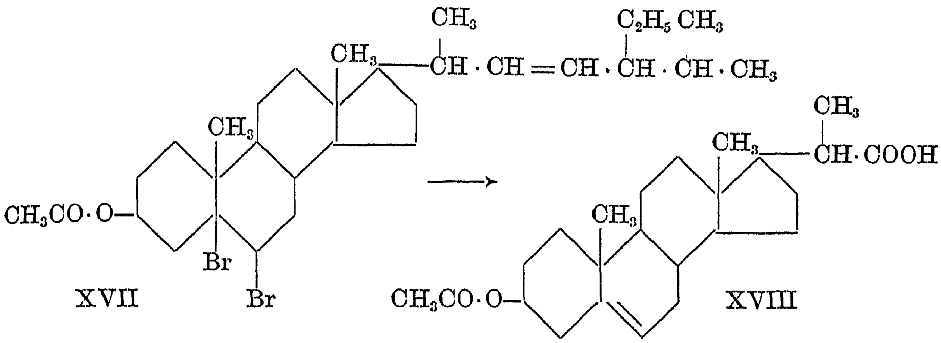
Corpus-luteum-Hormon, XVI,
(△ 4,5-Pregnen-dion-(3,20)

D II c. 1. Abbau des Stigmasterins zum Corpus-luteum-Hormon

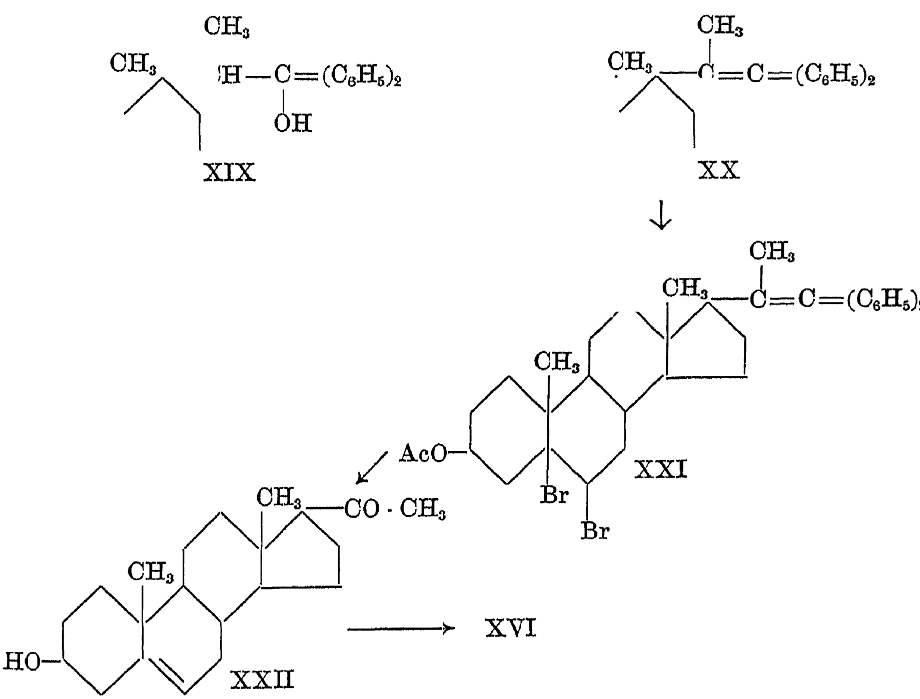
Butenandt und Mitarbeitern[51]) und Fernholz[52]) gelang es gleichzeitig das Progesteron durch Abbau von Stigmasterin darzustellen. Das Stigmasterin (s. S. 111) besitzt zwei Doppelbindungen, von denen sich die Kerndoppelbindung, wie Fernholz[53]) gefunden hat, durch Brom absättigen läßt, ohne daß hierbei die Seitenkettendoppelbindung angegriffen wird. Das Stigmasterin-acetat-dibromid (XVII) kann nun durch Ozonisierung in der Seitenkette gespalten werden, wobei neben dem flüchtigen Aethyl-isopropyl-acetaldehyd das Dibromid der 3-Acetoxy-

[47]) Butenandt, Westphal u. Hohlweg, H. 227, 84 (1934).
[48]) Slotta, Ruschig u. Fels, B. 67, 1270, 1624 (1934).
[49]) Hartmann u. Wettstein, H. Ch. A. 17, 878 (1934).
[50]) Allen u. Wintersteiner, Science 80, 190 (1934); J. biol. Chem. 107, 321 (1934).
[51]) Butenandt, Westphal u. Cobler, B. 67, 1611, 2085 (1934).
[52]) B. 67, 2027 (1934).
[53]) A. 507, 128 (1933).

bisnor-cholensäure entsteht. Das letztere Spaltstück wird als solches nicht isoliert, sondern durch Entbromung gleich in die gut kristallisierende 3-Acetoxy-bisnor-cholensäure (XVIII) übergeführt.



Der Methylester der Säure XVIII wird nach G r i g n a r d mit Phenylmagnesiumbromid umgesetzt und aus dem gebildeten tertiären Carbinol XIX Wasser abgespalten; auf diese Weise erhält man das Acetat des zweifach ungesättigten Alkohols XX. Zum weiteren Abbau wird in XX wiederum die Doppelbindung im Ringsystem mit Brom abgesättigt und das Acetat-dibromid XXI mit Ozon in Benzophenon und das Dibromid des acetylierten $\Delta^{5,6}$-Pregnenolons zerlegt, das schließlich nach Entbromung als Acetat zur Abscheidung gebracht wird. Wenn man



die Doppelbindung des freien Oxy-ketons XXII zunächst wieder durch Anlagerung von Brom schützt und das Dibromid vorsichtig in der Kälte mit Chromsäure oder Permanganat oxydiert, so läßt sich aus den Oxydationsprodukten nach der Entbromung schließlich das Corpus-luteum-Hormon (XVI) in reiner Form isolieren.

Die Verlagerung der Doppelbindung in die α-β-Stellung wird durch die selektive Lichtabsorption des Hormons gefordert und steht in Analogie zum Cholestenon, das aus Cholesterin in derselben Weise gebildet wird.

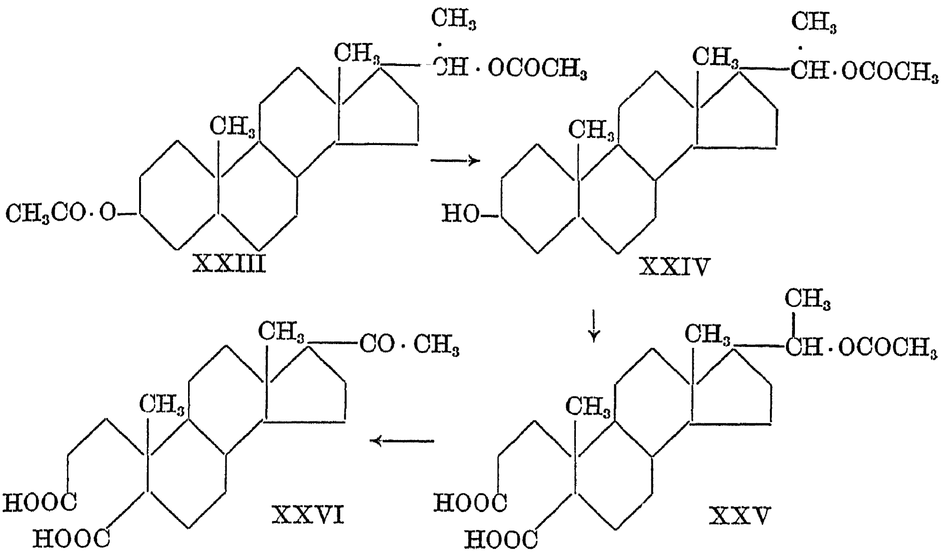
D IIc. 2. Abbau des Pregnandiols $C_{21}H_{36}O_2$ zum Corpus-luteum-Hormon $C_{21}H_{30}O_2$

Butenandt und Schmidt[54]) haben das Progesteron auch aus dem Pregnandiol, dem Begleitstoff des Follikelhormons, dargestellt. Die Verwandtschaft des Pregnandiols mit den Sterinen hatten Butenandt und Mitarbeiter[55]) durch seine Umwandlung in den gesättigten Kohlenwasserstoff, Pregnan genannt, beweisen können. Das Pregnan erwies sich als identisch mit dem Reduktionsprodukt des Actio-cholyl-methylketons, das Wieland als neutrales Reaktionsprodukt beim oxydativen Abbau der Bis-nor-cholansäure bekommen hatte (Formul. s. Tafel II). Einwandfrei geklärt ist seine Konstitution erst durch den im folgenden beschriebenen Übergang in das Progesteron. Die Grundlage zu diesem Abbauverfahren bildete die Beobachtung, daß das Diacetat des Pregnandiols (XXIII) partiell zu einem Monoacetat verseift werden kann. Die Konstitution des Pregnandiol-monoacetats (XXIV) folgt aus den Ergebnissen seiner Chromsäureoxydation, die unter Aufsprengung des Ringes A zu einer zweibasischen Säure (XXV) führt. Diese Säure liefert nach Entacetylierung und Oxydation der zweiten Hydroxylgruppe eine Keto-dicarbonsäure (XXVI), die schon früher aus Pregnandiol gewonnen worden war[55]).

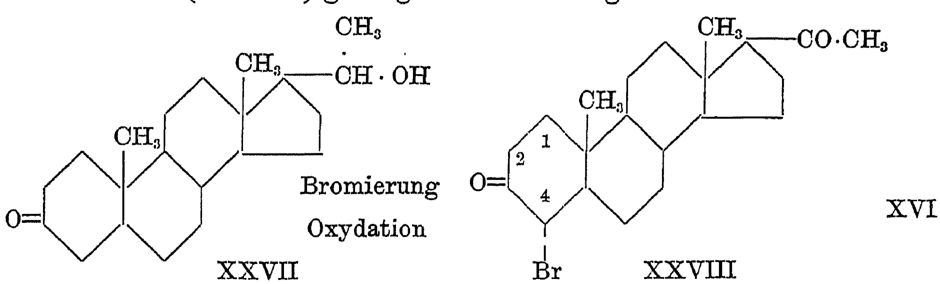
Die Dicarbonsäure XXVI geht bei der Brenzreaktion in ein cyclisches Keton über.

Das freie Hydroxyl am C-Atom 3 des Monoacetats XXIV wird durch Chromsäure in der Kälte zu einer Ketogruppe oxydiert und das Ketoacetat zum Pregnanol-(20)-on-(3) (XXVII) verseift. Dieses Oxy-keton (XXVII) liefert bei der Bromierung ein Monobrom-Derivat, das sich zu einem Brom-diketon XXVIII oxydieren läßt. Später wurde gefunden, daß dieses letztere auch direkt durch Bromierung von Pregnandion er-

[54]) B. 67, 1893, 1901 (1934).
[55]) B. 63, 659 (1930); B. 64, 2529 (1931).

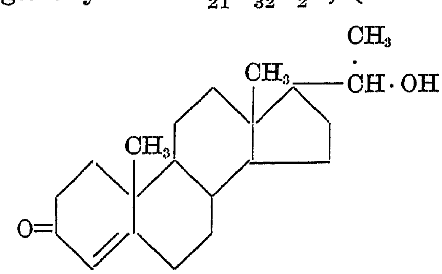


halten werden kann. Durch Abspaltung von Bromwasserstoff aus dem Bromdiketon (XXVIII) gelangt man zum Progesteron.



Die Möglichkeit, daß das Bromatom auch am C-Atom 2 auf der anderen Seite der Ketogruppe eintreten könnte, was nach Abspaltung von Bromwasserstoff zu einer Doppelbindung in 1,2-Stellung führen würde, wird durch die gleichzeitige Darstellung des Hormons aus Stigmasterin ausgeschlossen.

Das ungesättigte Oxy-keton $C_{21}H_{32}O_2$[56]) (XXIX),



XXIX, $\triangle^{4,5}$-Pregnenol-(20)-on-(3)

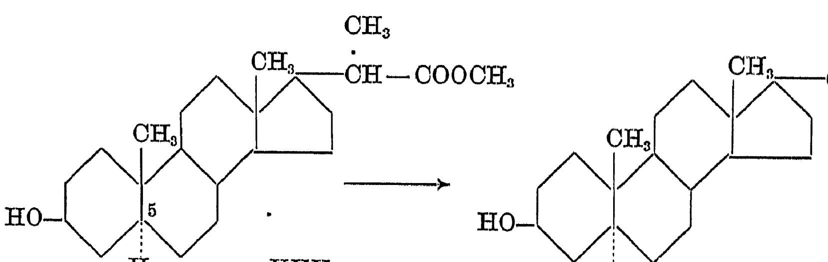
---

56) Butenandt u. Schmidt, B. 67, 2092 (1934).

das nach Bromierung des Ketons XXVII und Bromwasserstoffabspaltung ohne vorherige Oxydation erhalten wird, ist bemerkenswerterweise physiologisch gänzlich inaktiv, obwohl es sich vom Progesteron nur dadurch unterscheidet, daß es in der Seitenkette an Stelle der Ketogruppe des letzteren eine sekundäre Alkoholgruppe besitzt. Hieraus erhellt der spezifische Charakter des Corpus-luteum-Hormons.

D II c. 3. Allo-Pregnanol-(3)-on-(20), ein Begleitstoff des Progesterons[57])

Die Struktur eines physiologisch inaktiven, gesättigten Oxyketons $C_{21}H_{34}O_2$ (XXXI), eines Begleitstoffes des Progesterons, ist ebenfalls geklärt worden. Das Diketon, das man aus dem Oxy-keton XXXI durch Oxydation erhält, ist mit Pregnandion nicht identisch, sondern isomer, und zwar beschränkt sich diese Isomerie wie so oft bei den Sterinen und deren Abkömmlingen nur auf die verschiedene sterische Lage des Wasserstoffatoms am C-Atom 5. Dies wurde folgendermaßen bewiesen. Der Methylester der 3-Oxy-bisnor-allocholansäure (XXX) wurde nach der bekannten Methode von Wieland in der Seitenkette abgebaut, wobei das Acetat eines Oxy-ketons $C_{21}H_{34}O_2$ erhalten wurde; dieses lieferte bei der Verseifung allo-Pregnanol-(3)-on-(20) (XXXI), das sich mit dem inaktiven Oxy-keton aus Corpus-luteum-Extrakten als vollkommen identisch erwies.



XXX XXXI

Das Oxy-keton XXXI gehört also in die allo-Cholansäurereihe, während das Pregnandiol ein Derivat der Cholansäure darstellt. Da das Progesteron selbst eine Doppelbindung besitzt, die vom C-Atom 5 ausgeht, so können natürlich bei der Reduktion gleichzeitig Cholestan- und Koprostan-Derivate entstehen, je nach der Art der Wasserstoffanlagerung an das C-Atom 5. Es erscheint aus diesem Grunde möglich, daß das Pregnandiol und das allo-Pregnanol-(3)-on-(20) zwei der möglichen Reduktionsprodukte des Progesterons darstellen.

---

57) Butenandt u. Mamoli, B. 67, 1897 (1934).

Die Konstitutionsformeln der vorstehend behandelten Hormone (Testikelhormone, Follikelhormone, Corpus-luteum-Hormon) lassen die nahe Verwandtschaft der Keimdrüsenhormone zu den Sterinen klar zutage treten (s. a. die Übersicht Tafel II).

Isolierung des Corpus-luteum-Hormons und des allo-Pregnanolons[47]).

Als Ausgangsmaterial dienen Schweineovarien oder die daraus isolierten Corpora lutea. Das Progesteron findet sich in den in Benzol, Aceton und Äther löslichen Anteilen des Ovarialgewebes. Wie das Follikelhormon läßt es sich von vielen Begleitstoffen durch Verwendung von zwei Entmischungsmethoden trennen: Bei der Verteilung zwischen 70proz. Methanol und Petroläther verbleibt es in der alkoholischen, bei anschließender Entmischung seiner 80proz. Lösung in Alkohol mit Benzol in der benzolischen Phase. Nach Überführung in eine konz. alkoholische Lösung kann man durch vorsichtigen Wasserzusatz (bis auf 33%) weitere Verunreinigungen ausfällen und so eine in Äther leicht lösliche Fraktion gewinnen, die mit 3,5—5,5 mg als Gesamtdosis die drüsige Umwandlung der proliferierten Uterusschleimhaut bewirkt. Durch Umsatz dieser hochgereinigten öligen Chargen mit Semicarbazid in alkoholischer Lösung läßt sich praktisch die gesamte physiologisch wirksame Substanz in Gestalt eines schwer löslichen Rohsemicarbazons fällen, das sich um 260° zersetzt. Das Rohsemicarbazon liefert bei der Spaltung mit verd. Säuren ein teilweise kristallisiertes Öl, das im Hochvakuum bei 0,001 mm Hg und 120° fraktioniert wird. Das Sublimat wird aus Alkohol fraktioniert kristallisiert. Sowohl die schwerer löslichen Anteile (ca. 70%, Schmp. 145—155°) als auch die leichter löslichen Anteile (ca. 30%, Schmp. 75—85°) sind in Dosen von 1 mg physiologisch wirksam.

Aus den leichter löslichen Anteilen läßt sich nach Umkristallisieren aus verd. Alkohol und verd. Aceton (Schmp. um 110°) und nochmaliger Hochvakuumsublimation (Schmp. 117—118°) und anschließendem Umkristallisieren aus verd. Alkohol das Corpus-luteum-Hormon (XVI) (Schmp. 128,5°) rein darstellen. Das Progesteron kristallisiert in zwei polymorphen Modifikationen, die sich ineinander überführen lassen: in stark lichtbrechenden, dicken Rhomben vom Schmp. 128,5° und langen, gut ausgebildeten Nadeln vom Schmp. 121—122°; physiologische Wirksamkeit: 1 K. E. = 0,75 mg; $[\alpha]_D = +200°$ (Chloroform). Dioxim, durch Kochen mit Hydroxylaminacetat in alkoholischer Lösung, Kristalle aus verd. Alkohol, Schmp. 243° (Zers.).

Aus den schwerer löslichen Anteilen kann man nach Acetylierung durch fraktionierte Kristallisation des Rohacetats aus verd. Alkohol das Acetat vom allo-Pregnanol-(3)-on-(20) isolieren, flache Blättchen aus verd. Alkohol, Schmp. 144,5°. allo-Pregnanol-(3)-on-(20) (XXXI), Kristalle aus verd. Alkohol, Schmp. (nach Hochvakuumsublimation) 194°; Oxim, Kristalle aus Alkohol, Schmp. 224°. allo-Pregnandion, durch Oxydation von allo-Pregnanolon mit Chromsäure in Eisessig bei 20°, Kristalle aus verd. Alkohol, Schmp. 200,5°. Dioxim, Kristalle aus verd. Alkohol, Schmp. 260°.

Progesteron aus Stigmasterin[51]) [52]).

3-Acetoxy-bisnor-cholensäure (XVIII). Eine Lösung von 6 g Stigmasterin-acetat in 100 ccm Chloroform wird unter Kühlung mit 2,1 g Brom in 50 ccm Chloroform in dünnem Strahle versetzt (Bildung von XVII) und anschließend 6 Stunden ozonisiert. Nach Abdampfen des Chloroforms i. V. wird das Ozonid mit Zinkstaub und Eisessig eine Stunde auf dem Wasserbade erwärmt. Die ätherische Lösung des Reaktionsproduktes wird dann mit 2 n-Natronlauge durchgeschüttelt, wobei sich das Natriumsalz von XVIII abscheidet. Die freie Säure (XVIII) kristallisiert aus Aceton in Blättchen, Schmp. 235° (Zers.). Methylester, Blättchen aus Methanol, Schmp. 138—139°.

Carbinol XIX und Anhydro-produkt XX. Der Methylester von XVIII wird mit Phenyl-magnesiumbromid umgesetzt. Nach dem Zersetzen wird das Reaktionsprodukt mit methylalkoholischer Kalilauge gekocht und nach dem Ansäuern mit Wasserdampf destilliert. Nach Abtrennen von sauren Produkten wird der nicht flüchtige, neutrale Anteil mit Eisessig gekocht und dann im Hochvakuum (0,001 mm Hg, Fraktion 190—280°) destilliert. Das Destillat wird durch Kochen mit Essigsäureanhydrid acetyliert und schließlich aus verd. Alkohol umkristallisiert (XX), Schmp. 216 bis 217°.

$\Delta^{5,6}$-Pregnenolon (XXII). Eine Lösung von XX in Chloroform wird unter Kühlung mit einer chloroformischen Lösung von zwei Atomen Brom je Mol versetzt (Bildung von XXI) und dann ozonisiert. Nach ½stdg. Erwärmen des Ozonids mit Zinkstaub und Eisessig wird die ätherische Lösung des Reaktionsproduktes mit 2 n-Natronlauge und Wasser gewaschen. Der Ätherrückstand wird in alkoholischer Lösung mit Semicarbazidacetat gekocht und das Acetat-semicarbazon von XXII durch vorsichtigen Wasserzusatz in feinen Nadeln abgeschieden, Umkristallisieren aus Alkohol, Schmp. 262—263° (Zers.). Nach Kochen mit verd. alkoholischer Schwefelsäure erhält man aus dem Semicarbazon das freie Oxy-keton XXII, prismatische Nadeln aus verd. Alkohol, Schmp. 190°.

Progesteron, $\Delta^{4,5}$-Pregnen-dion-(3,20) (XVI). XXII wird in Eisessig gelöst und mit einer Eisessiglösung von zwei Atomen Brom je Mol versetzt. Dann wird zu der Lösung in der Kälte tropfenweise eine 5 Atomen Sauerstoff entsprechende Menge Chromtrioxyd in Eisessig hinzugegeben. Nach 20stdg. Stehen bei 20° wird mit Wasser und Äther aufgearbeitet. Der Ätherrückstand wird mit Zinkstaub und Eisessig erwärmt und das wieder mit Äther isolierte bromfreie Reaktionsprodukt bei 130° und 0,001 mm sublimiert. Das Sublimat liefert aus verd. Alkohol Kristalle vom Schmp. 128,5°, die mit natürlichem Progesteron identisch sind.

Pregnandiol $C_{21}H_{36}O_2$[55] [58]). Darstellung aus Schwangerenharn (vgl. Tabelle S. 258), Täfelchen aus Alkohol oder Aceton, Schmp. 234—235°.

Pregnandiol-diacetat (XXIII), Nadeln aus Alkohol, Schmp. 180°.

Pregnandion, aus Pregnandiol durch Chromsäureoxydation in der Kälte, Nadeln aus Alkohol, Schmp. 123°; Dioxim, prismatische Nadeln aus Alkohol, Zers. 260°. Keto-dicarbonsäure $C_{21}H_{32}O_5$ (XXVI). Aus Pregnandiol durch Chromsäureoxydation in der Wärme, Prismen aus Alkohol-

[58]) Marrian, Bioch. J. 23, 1090 (1929).

Essigester, Schmp. 270°, $[\alpha]_D^{21} = + 125{,}2°$ (Pyridin); Dimethylester, feine Nadeln aus verd. Alkohol, Schmp. 113°.

Pregnandiol-monoacetat-(20) (XXIV)[54]), durch partielle Verseifung von XXIII, Kristalle aus Alkohol und verd. Aceton, Schmp. 170,5°.

Pregnanolon-(3) (XXVII)[54]). Durch Oxydation von XXIV mit Chromtrioxyd bei 15—20° zum Keto-acetat (Nadeln aus Alkohol, Schmp. 142—142,5°) und Verseifung des Acetylrestes; XXVII kristallisiert aus Alkohol und Aceton in Prismen, Schmp. 152°.

Brom-pregnanolon-(3)[54], aus XXVII mit 1 Mol Brom in Eisessig, Nadeln aus Alkohol und verd. Aceton, Schmp. 185° (Zers.).

Brom-pregnandion (XXVIII)[54]), durch Chromsäureoxydation von Brom-pregnanolon oder durch Bromierung von Pregnandion, Nadeln aus Alkohol und verd. Aceton, Schmp. 186—187° (Zers.). Die Bromwasserstoffabspaltung, die zum Progesteron führt, wird durch 12stdg. Kochen mit wasserfreiem Pyridin bewerkstelligt.

$\Delta^{4,5}$-Pregnenolon-(3) (XXIX), durch 12stdg. Kochen von Brom-pregnanolon-(3) mit abs. Pyridin, Kristalle aus Alkohol, Schmp. 159°; $[\alpha]_D^{20} = + 89{,}7°$ (abs. Alkohol). Acetat, Kristalle aus verd. Alkohol, Schmp. 138,5°.

E. Über das Vitamin D und die Bestrahlungsprodukte des Ergosterins

E I. Das natürliche Vitamin D

„Vitamine sind organische Substanzen, die in kleinster Menge dauernd dem tierischen Organismus zugeführt werden müssen, um die Erhaltung oder Vermehrung der Zellsubstanz zu ermöglichen und die normale Funktion der Organe zu gewährleisten. Nur dann sind derartige Substanzen als Vitamine zu bezeichnen, wenn sie unter geeigneten Bedingungen bereits in einer Menge wirksam sind, deren Kleinheit ihre Verwendung zur Kalorienlieferung sowie als direktes Baumaterial der Zellsubstanz ausschließt, und wenn die Zelle selbst zu ihrer Totalsynthese von sich aus nicht befähigt ist" (Stepp und Kühnau, Klin. Fortbildung 1933, 41).

Im Jahre 1906 sprach Hopkins zum erstenmal die Vermutung aus, daß die Rachitis auf den Mangel der Nahrung an irgend einem Zusatzstoff zurückzuführen sei, den wir heute nach der oben gegebenen Definition ein Vitamin nennen. Die Rachitis ist demnach als eine Mangelkrankheit, eine Avitaminose, anzusehen. Eingehende Untersuchungen, die vor allem mit den Namen Mellanby, McCollum, Sherman und Pappenheimer verknüpft sind, haben diese Vermutung beweisen können. Es zeigte sich, daß man Versuchstiere (als solche wurden meist Ratten verwendet) durch Fütterung einer Kost, der das „antirachitische Prinzip" fehlt, rachitisch machen, daß man also experimentell eine Rachitis erzeugen kann. Andererseits läßt sich sowohl die experimentelle wie die Spontanrachitis durch Gabe von tierischen und pflanzlichen Ölen, die den antirachitisch wirksamen Stoff enthalten, ausheilen. Von solchen Stoffen zeigt der Lebertran, der schon früher als Hausmittel gebraucht wurde, die beste Wirkung[1]).

Die Symptome der Rachitis bestehen im wesentlichen in Skelettveränderungen und Veränderungen im Mineralstoffwechsel, die von allgemeiner Resistenzverminderung und Wachstumshemmung begleitet sind.

[1]) Sherman-Smith, Vitamins. New York 1931.

Die Skelettveränderungen lassen sich äußerlich an der Ausbildung des sog. Rosenkranzes erkennen, es tritt eine Schwellung der Knochen-Knorpelgrenzen an den Rippen ein. Die mangelnde Kalkablagerung an den Knochenenden läßt sich leicht durch die histologische oder durch die Röntgenuntersuchung feststellen. Beim normalen wachsenden Knochen verläuft die provisorische, präparatorische Verkalkungszone, in der die Verkalkung vor sich geht, in einer geraden Linie. Bei einem rachitischen Knochen erscheint sie zunächst ausgefranst und verschwindet schließlich völlig, es kommt zur Bildung großer Mengen unverkalkten Osteoids. Bei der Heilung der Rachitis wird diese Zone von dem Epiphysenende her wieder mit Kalksalzen ausgefüllt. Die Veränderungen im Mineralstoffwechsel bestehen in einer Störung der Ca-PO_4-Bilanz des tierischen Organismus, die sich in der veränderten Zusammensetzung der Knochen und in einem Absinken des Calcium- und Phosphatgehalts des Serums bemerkbar macht. Die Aschenmenge eines normalen Knochens einer 6 Wochen alten Ratte beträgt 62%, während bei einer rachitischen Ratte nur 26% gefunden[2]) werden.

In ihrem äußerlichen Bild gleicht die experimentelle Rachitis vollkommen der Spontanrachitis, doch lassen sich histologisch Unterschiede feststellen. Auch ist die experimentelle Rachitis durch erhöhte Phosphatgaben in der Nahrung beeinflußbar. Immerhin aber hat sie die Grundlage für die Ausarbeitung von Testmethoden gegeben, die eine Wertbestimmung von Präparaten, die das antirachitische Vitamin enthalten, gestatten.

Zur Erzeugung der experimentellen Rachitis werden junge Ratten (auch Mäuse, Kaninchen, Schweine und Küken sind verwendet worden) im Alter von 3—5 Wochen auf eine rachitogene Kost gesetzt. Die Nahrung muß alle notwendigen Bestandteile außer dem antirachitischen Vitamin enthalten. Doch läßt sich die Mangelkrankheit nur erzeugen, wenn ein ganz bestimmtes Verhältnis von Kalk zu Phosphat vorhanden ist. Eine Kost, die Kalk und Phosphat im Verhältnis 2:1 enthält, wirkt nicht rachitogen. Erst eine Steigerung des Verhältnisses auf über 3,5:1 bedingt bei gleichzeitigem Fehlen des Vitamins die Entstehung der Rachitis. Auch der Absolutbetrag des Angebotes an Kalk und Phosphat darf nicht zu hoch steigen[3]). Die meist benutzte antirachitische Kost ist die McCollum 3143:[4]) Sie besteht aus 33% Weizen, 33% Mais, 15% Weizenkleber, 15% Gelatine, 3% $CaCO_3$ und 1% NaCl. Um die aus dem Phosphatgehalt

[2]) Deutscher c. s., J. biol. Chem. 70, 173 (1929).

[3]) s. Bomskow.

[4]) McCollum c. s., J. biol. Chem. 45, 333 (1921).

der Nahrung und auch aus individuellen Faktoren herrührenden Fehlerquellen bei den Testmethoden auszuschließen, ist die gleichzeitige Fütterung eines unten beschriebenen Standardpräparats bei diesen Versuchen zweckmäßig.

Als Testmethode verwendet man sowohl therapeutische als prophylaktische Methoden. Im ersten Fall prüft man, welche Dosis eben ausreicht, eine floride Rachitis zu heilen (Heildosis), im zweiten, welche Dosis des zu untersuchenden Präparats gerade noch die Entstehung der Experimentalrachitis verhindert (Schutzdosis). Die Heildosis ist stets größer als die Schutzdosis[5]). Hier seien nur die Methoden erwähnt, die die breiteste Anwendung gefunden haben. (Eine eingehende Darstellung der Testmethoden findet man in: Bomskow, Methoden der Vitaminforschung, Verlag Thieme 1935.)

I. Therapeutische Methoden.

a) „Line-Test"[6]). Drei Gruppen von rachitischen Tieren werden mit rachitogener Kost ohne Zusatz, mit Zusatz einer Standardlösung und mit Zusatz einer Lösung der zu untersuchenden Substanz 10—14 Tage lang gefüttert. Die Kontrolltiere müssen dann noch rachitisch sein. Der Grad der Heilung wird durch die Breite der an der Epiphysengrenze abgelagerten Calciumphosphatschicht bestimmt, die folgendermaßen erkennbar gemacht wird: Der herauspräparierte Knochen (Tibia oder Femur) wird gespalten, mit Silbernitratlösung getränkt und belichtet. Aus dem abgelagerten Calciumphosphat bildet sich Silberphosphat, das unter der Einwirkung des Lichts freies Silber abscheidet und so durch Schwarzfärbung die Heilungszone unmittelbar sichtbar macht.

b) Röntgenmethode[7]). Zur Diagnosestellung wird das Kniegelenk der Ratten vor dem Versuch und nach 14tägiger Fütterung der Lösung durch Röntgenuntersuchung auf Rachitis, bzw. auf Heilung untersucht. Durch Standardskalen lassen sich einzelne Heilstufen festlegen.

II. Prophylaktische Methoden.

[5]) Schieblich, Bio. Z. 230, 312 (1930).

[6]) Mc Collum c. s., J. biol. Chem. 51, 41 (1927). Coward c. s., Quart. J. of Pharm. 1, 27 (1928). Bills c. s., J. biol. Chem. 90, 619 (1931). Key c. s., Biochem J. 26, 196 (1932). Morgan c. s., Biochem. J. 26, 1144 (1932).

[7]) Schultz, Z. Kinderheilk. 47, 472 (1929). Erg. Path. 28, 393 (1934). Bourdillon c. s., His Majestys Stat. Off. 1931. Spec. Rep. Ser. Med. Res. Council London Nr. 158, Biochem. J. 26, 506, 522 (1932). Poulsson c. s., Biochem. J. 22, 134 (1928). van Everse u. Nickerk, Neederl. Tijdskr. Geneesk. 75, 1101 (1931). C. 1931 I, 2781.

a) Röntgenmethode[8]). Zur Diagnosestellung wird auch hier die Untersuchung des Kniegelenks vorgenommen. Drei Gruppen der Versuchstiere (zur exakten Bestimmung benutzt man mindestens je 10 Tiere) werden 14 Tage lang wiederum mit der rachitogenen Kost allein, mit Zusatz eines Standardpräparats und mit Zusatz des zu prüfenden Präparats gefüttert. Eine Substanz gilt in der gegebenen täglichen Dosis als wirksam, wenn mindestens 80% der Versuchstiere geheilt sind und gleichzeitig einen Gewichtszuwachs von 12% zeigen. Die Kontrolltiere müssen noch rachitisch sein.

b) Gravimetrische Methode[9]). Zur Diagnosestellung wird der Aschegehalt der Knochen, etwa der Hinterbeine, der Versuchstiere, ermittelt. Er wird mit dem von Kontrolltieren verglichen, die mit einem Standardpräparat gefüttert wurden. Diese Methode ist die objektivste, doch nimmt ihre Durchführung die meiste Zeit in Anspruch, sodaß sie zu serienmäßigen Bestimmungen nicht geeignet ist.

Als Standardpräparat ist von der Vitaminkonferenz des Völkerbundes[10]) eine Lösung von bestrahltem Ergosterin (s. u.) in Olivenöl festgelegt worden. Eine 0,1%ige Lösung von Ergosterin in abs. Alkohol wird im Quarzrohr im Abstand von 15 cm 30 Minuten lang im unfiltrierten Licht der Quarzquecksilberlampe bestrahlt. Der Alkohol wird im Vakuum bei 45° entfernt und aus dem Rückstand eine 0,01%ige Lösung in Olivenöl hergestellt. 1 mg dieser Lösung ist die internationale Einheit[11]) (auch M.R.C.-Einheit, Medical Research Council-Einheit). Eine Einheit entspricht also 0,1 γ bestrahltem Ergosterin. Eine klinische Einheit ist rund gleich dem 14fachen der internationalen Einheit.

Die Ausarbeitung und Vervollkommnung der Testmethoden ermöglichte es, die verschiedenen Nahrungsstoffe auf ihren Gehalt an antirachitischem Vitamin zu untersuchen, seine Anreicherung zu versuchen und seine Eigenschaften festzustellen. Der antirachitisch wirksame Faktor erwies sich ebenso wie das Vitamin A als fettlöslich und da er dieses meist begleitet, schrieb man zunächst die antirachitische und die anti-

[8]) Windaus u. Holtz, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen 1927, H. 2. Scheunert u. Schieblich, Bio. Z. 209, 290 (1929). Holtz, Laquer, Kreitmair u. Moll, Bio. Z. 237, 247 (1931). Bourdillon-Bruce, Biochem. J. 26, 506 (1932).

[9]) Chick c. s., Biochem. J. 20, 622 (1926). Soames c. s., Biochem. J. 22, 522 (1928). Hume c. s., Biochem. J. 26, 488 (1932). Shennan-Stiebeling, J. Biol. Chem. 83, 497 (1929), 88, 687 (1930).

[10]) Völkerbund, Rapp. de la confer. pour la standard. d. vit. tenue à Londres, No. C. H. 1055, I. Sér. d. Publ. III. Hygiène, Genf 1931, III.

[11]) Wurde von der Londoner Vitamin-Konferenz 1934 beibehalten.

xerophtalmische Wirkung dem gleichen Stoff, dem Vitamin A zu. Doch wurde man bald auf eine unterschiedliche Verteilung der beiden Faktoren in verschiedenen Fetten aufmerksam und konnte auch eine verschiedene Beständigkeit der einzelnen Faktoren bei der Einwirkung von Luftsauerstoff bei 100° feststellen: die antixerophtalmische Wirkung verschwindet hierbei, während die antirachitische erhalten bleibt[12]). Es muß also ein selbständiges antirachitisches Vitamin existieren, das man als Vitamin D bezeichnet hat[13]).

Besonders reichlich findet sich das Vitamin in den Leberölen von Knochenfischen wie Dorsch und Thunfisch, den höchsten Gehalt hat die Leber von Spheroides maculatur (Pufferfisch) aufzuweisen[14]). Der käufliche Lebertran enthält im Durchschnitt 2 mg Vitamin pro Kilo (verglichen mit dem künstlichen Vitamin s. u.), doch schwankt der Gehalt stark[15]), wahrscheinlich infolge der Verfahren, die zur Hebung seines Geschmacks durchgeführt werden. Die anderen Nahrungsmittel sind relativ arm an Vitamin D: Butter, Milch, Eier, Gemüse und Speisepilze zeigen im Vergleich zum Lebertran geringe und schwankende Wirkung. Lebertran enthält pro Gramm 0,2 bis 2 klinische Einheiten, Butter nur 0,002 bis 0,1, Milch 0,001 bis 0,002 Einheiten[16]). Da der Bedarf eines Kindes täglich gleich einer klinischen Einheit ist und zur Heilung einer floriden Rachitis mindestens 5 Einheiten notwendig sind, besteht gerade in unserer Nahrung die Gefahr eines Vitamin D-Mangels.

Die Versuche zur Isolierung und Reindarstellung des natürlichen Vitamin D sind noch nicht von Erfolg gewesen, immerhin konnten aber schon wesentliche Anreicherungen erzielt werden. Das Vitamin findet sich im unverseifbaren Anteil des Lebertrans. Durch Verseifung des Lebertrans und Extraktion der alkalischen Lösung mit organischen Lösungsmitteln läßt sich eine Anreicherung des Vitamins erreichen, die durch Abtrennung der begleitenden Sterine noch erhöht werden kann (bis auf das 10000fache)[17]). Das begleitende Vitamin A kann durch

[12]) Goldblatt u. Zilva, Lancet 1923 II, 647.

[13]) Drummond, Chemistry and Ind. 43, 908, 928 (1924).

[14]) Bills, J. biol. Chem. 72, 251 (1927). Poulsson, Strahlentherapie 34, 648 (1929). Hess c. s., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 23, 407 (1926).

[15]) Seel, Z. f. Vit.-Kunde 1930, 174. Nelson u. Walker, C. 1932, I. 2861.

[16]) Crawford c. s., Biochem. J. 24, 682 (1930). Drummond c. s., C. 1931, II, 1879. Hess, J. Am. Med. Ass. 81, 15 (1923). Scheunert u. Reschke, D. med. Ws. 57, 349 (1931). Scheunert, Der Vitamingehalt d. dtsch. Nahrungsmittel, Berlin 1930.

[17]) Zucker, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 20, 136 (1922). Dubin u. Funk, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 21, 458 (1924).

Adsorptionsmittel oder durch Addition von Maleinsäureanhydrid entfernt werden[18]). Ender[19]) kam durch Umwandlung des Vitamins in den sauren Phtalester, der sich auf Grund seiner Alkalilöslichkeit von neutralen Begleitstoffen trennen läßt, zu Produkten, die in einer Dosis von 0,03—0,04 γ antirachitisch sein sollen. Spätere Bearbeiter[18]) haben eine solche Wirksamkeit jedoch nicht wieder erreichen können. Die besten im Göttinger Institut hergestellten Präparate zeigen im Schutzversuch eine Wirkung von 0,2 γ[20]).

Das natürliche Vitamin D ist fettlöslich und leichtlöslich in den meisten organischen Lösungsmitteln. Es setzt sich nur aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff zusammen[13]). Es enthält eine veresterbare Hydroxylgruppe[19]), fällt jedoch im Gegensatz zu den begleitenden Sterinen nicht mit Digitonin[21]). Gegen milde chemische Agenzien (Wasserstoffsuperoxyd, Schwefelwasserstoff, schweflige Säure und Formaldehyd) ist es stabil, von Mineralsäuren[22]) und durch Erhitzen auf 200° wird es rasch zerstört. Unter Luftausschluß bei Zimmertemperatur ist es jahrelang haltbar[21]).

E II. Rachitis und Licht. Existenz eines Provitamins D

Schon im Jahre 1912 sprach Raczynski[1]) die Vermutung aus, daß die Rachitis mit einem Mangel an Sonnenlicht zusammenhängen könne. 1919 konnte der Berliner Arzt Huldschinsky[2]) an einem breiten klinischen Material zeigen, daß das Sonnenlicht, und vor allem das ultraviolette Licht, eine vorzügliche Eignung als Heilmittel gegen die Rachitis zeigt. Einen Zusammenhang zwischen Rachitis-heilenden Faktoren und dem Licht konnten auch Hess und Lundagen[3]) feststellen, die fanden, daß der Gehalt des Bluts an freiem Phosphat parallel mit den jahreszeitlichen Schwankungen des Sonnenlichts an ultravioletten Wellen ansteigt und absinkt. Ratten, die eine rachitogene Kost erhalten, lassen sich auch auf diese Weise vor Rachitis schützen[4]). Das

18) Dalmer, v. Werder u. Moll, H. 224, 86 (1934).
19) Z. f. Vitaminf. 2, 241 (1933), 3, 161 (1934).
20) Unveröffentl. Versuche von Windaus u. Mitarb.
21) Nelson u. Steenbock, J. biol. Chem. 64, 299 (1925).
22) Bills, J. biol. Chem. 64, 1 (1925).
23) Southgate, Biochem. J. 19, 733 (1925).
1) Compt. rend. ass. intern. pédiatrie 308, 309 (1913).
2) D. med. Ws. 45, 712 (1913). Z. orthop. Chir. 39, 426 (1919—20).
3) J. Am. Med. Ass. 79, 2210 (1922).
4) Hess u. Unger, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 18, 298 (1921).

ultraviolette Licht zeigt also die gleiche Wirkung, die auch einem Stoff, dem Vitamin D, zukommt.

Diese scheinbar zusammenhanglosen Arten der Heilwirkung von Licht und einem Vitamin konnten Steenbock[5]) und Hess[6]) auf einen gemeinsamen Grund zurückführen: Sie fanden nahezu gleichzeitig und unabhängig voneinander, daß es gar nicht notwendig ist, den Rachitiskranken oder das kranke Tier der Einwirkung des ultravioletten Lichts auszusetzen, sondern daß es genügt, seine Nahrung zu bestrahlen. Dieser Effekt muß so gedeutet werden, daß in den Nahrungsstoffen und auch in der Haut eine Substanz vorhanden ist, die als solche nicht antirachitisch wirksam ist, sondern erst durch das ultraviolette Licht in ein Vitamin übergeführt wird. Deutlich erkennt man die Existenz eines solchen „Provitamins D“ z. B. an der Tatsache, daß Milch, die unbestrahlt pro Gramm 0,001 klin. Einheiten enthält, nach der Ultraviolettbestrahlung eine Wirkung von 0,8 Einheiten hat[7]). Pflanzenöle, die vor der Bestrahlung nahezu physiologisch unwirksam sind, werden durch Bestrahlung wirksam. Auch die photochemische Bildung des natürlichen Vitamins aus einem Provitamin scheint wahrscheinlich. Sommermilch zeigt größere Wirksamkeit als Wintermilch und ebenso Sommerspinat eine größere gegenüber Winterspinat[8]), frei gewachsene Pilze gegenüber Champignons[9]). Umso merkwürdiger muß aber der hohe Gehalt der Fischleber an Vitamin D erscheinen, wenn man die photochemische Bildung des Vitamins aus einem Provitamin als einzige Möglichkeit zu seiner Entstehung annehmen will, denn diese tieflebenden Fische wie der Dorsch dürften kaum von einer ausreichenden Menge kurzwelligen Lichts zur Durchführung der Photoreaktion erreicht werden. Zur Erklärung wird angenommen, daß diese Tiere ein ungewöhnlich großes Speicherungsvermögen für das Vitamin besitzen[10]). Coppens und Metz[11]) konnten zeigen, daß das Lungengewebe der Ratte auf das Vitamin D zerstörend wirkt, sodaß das Fehlen der Lunge bei den Fischen das Speicherungsvermögen erklären kann. Man wird jedoch die Mög-

[5]) J. biol. Chem. 61, 405 (1924).

[6]) J. biol. Chem. 62, 301 (1924).

[7]) Zit. nach Scheunert, Handb. d. Lebensmittelchemie. Vitamine.

[8]) Chick u. Roscoe, Biochem. J. 20, 137 (1926).

[9]) Scheunert u. Reschke, D. med. Ws. 57, 349 (1931). H. 235, 91 (1935).

[10]) Drummond, Nature 126, 398 (1930).

[11]) Bio. Z. 266, 169 (1933).

lichkeit einer reinen Chemosynthese, als zweitem Weg zur biologischen Bildung des Vitamin D, nicht von der Hand weisen können[12]).

E III. Ergosterin als Provitamin D

Bei der Untersuchung der pflanzlichen Öle, die man in bestrahlter Form den Versuchstieren gegeben hatte, zeigte es sich, daß der aktivierbare Stoff, das Provitamin, sich im unverseifbaren Anteil des Öles befindet. Da dieser im wesentlichen aus Phytosterinen besteht, untersuchte man diese Stoffe auf ihre antirachitische Aktivierbarkeit und fand, daß sie nach der Bestrahlung schon in außerordentlich kleinen Mengen (1 mg) antirachitisch waren. Die gleiche Feststellung konnte man mit dem Cholesterin machen und so glaubte man nun, in den Sterinen das Provitamin D gefunden zu haben[1]).

Pohl[2]) untersuchte das Ultraviolett-absorptions-spektrum des Cholesterins und fand, daß es ein ausgeprägtes Maximum bei 280 mμ zeigt. Im Laufe der Bestrahlung wird dieses Maximum abgebaut und nach den kürzeren Wellenlängen hin verschoben. Aus der Änderung, die das Spektrum bei der Bestrahlung nahm, mußte man schließen, daß schon nach relativ kurzer Bestrahlungszeit eine große Menge des Cholesterins photochemisch umgesetzt war. Hiermit stand aber das Verhalten des erhaltenen Bestrahlungsprodukts in vollkommenem Widerspruch. Das bestrahlte Cholesterin unterschied sich außer durch seine physiologische Wirksamkeit in nichts von dem unbestrahlten Cholesterin; seine Löslichkeit, seine physikalischen und chemischen Eigenschaften hatten sich nicht nachweisbar geändert. Es zeigte sich weiter, daß man das bestrahlte Cholesterin durch Umkristallisieren von der physiologischen Wirksamkeit befreien konnte. Das so gewonnene Cholesterin war nun nicht mehr durch ultraviolettes Licht antirachitisch aktivierbar. Die gleiche Eigenschaft hatten Cholesterinpräparate, die über das Cholesterindibromid oder das Hydrochlorid gereinigt waren, wie von Rosenheim[3]) zuerst gezeigt wurde. In dem aus Organen isolierten Cholesterin und in den Phytosterinen muß also eine äußerst geringe Menge eines Begleitstoffes vorhanden sein, die das eigentliche Provitamin D darstellt und die durch noch so häufiges Umkristallisieren nicht von ihnen getrennt

[12]) Bills, J. biol. Chem. 72, 751 (1927).

[1]) Hess c. s., J. biol. Chem. 63, 305 (1925). Steenbock c. s., J. biol. Chem. 64, 263 (1925). Rosenheim u. Webster, Lancet 1925, I, 1025.

[2]) Naturwissenschaften 15, 433 (1927).

[3]) Rosenheim u. Webster, Biochem. J. 21, 389 (1927).

werden kann. Da das durch Bestrahlung oder auf chemischem Wege gereinigte Cholesterin keine Ultraviolettabsorption bis 240 mμ zeigt, muß das Absorptionsmaximum bei 280 mμ dem eigentlichen Provitamin zukommen. Windaus u. Hess[5]) verglichen nun die Ultraviolettspektren aller bekannten Sterine mit dem des Provitamins und entdeckten, daß das Ergosterin, das Sterin der Hefe, ganz das gleiche Spektrum besitzt[4]). Tatsächlich ließ sich das Ergosterin durch Bestrahlung in ein Produkt überführen, dessen Wirksamkeit mehr als 1000mal so groß war als die des bestrahlten Roh-Cholesterins. Damit war nun im Ergosterin das Provitamin D gefunden; es soll in allen tierischen und Pflanzensterinen in kleinen Mengen enthalten sein und so deren Aktivierbarkeit hervorrufen; auch in der Haut ist es nachgewiesen worden[5]). Man muß sich jedoch vor Augen halten, daß die Schlußfolgerung über die Identität von Provitamin D und Ergosterin nur nach einer indirekten Methode, durch Vergleich der Ultraviolettspektren, gezogen wurde. Ein direkter Vergleich der beiden Stoffe ist bis heute noch nicht möglich gewesen, da das Provitamin sich auf Grund seiner ganz analogen Löslichkeitsverhältnisse nicht oder nur äußerst schwierig von seiner Begleitsubstanz, die in mehr als 10000facher Menge vorhanden ist, trennen läßt.

Nachdem im Ergosterin eine gut zugängliche Substanz gefunden war, die leicht in einen antirachitisch wirksamen Stoff verwandelt werden kann, richtete die Forschung ihre Bemühungen darauf, aus dem Bestrahlungsprodukt des Ergosterins den antirachitisch wirksamen Faktor in einheitlicher, kristallisierter Form zu fassen. Die Versuche zur Anreicherung und Isolierung des natürlichen Vitamin D wurden zurückgestellt. Doch der so einfach erscheinende Weg führte noch nicht zu einem raschen Erfolg. Das photochemische Umwandlungsprodukt des Ergosterins stellte ein farbloses Öl dar, das allen Kristallisationsversuchen trotzte. Man war daher zunächst nur auf eine indirekte Untersuchung des Bestrahlungsvorganges und der entstehenden Produkte angewiesen. Die Eigenschaft des Bestrahlungsprodukts, nicht mehr mit Digitonin eine schwer lösliche Anlagerungsverbindung zu bilden, erwies sich als sehr wertvoll zu seiner Gewinnung, da man mit Hilfe dieser Fällungsreaktion das photochemisch unveränderte Ergosterin quantitativ abtrennen und auch den photochemischen Umsatz auf diese Weise exakt bestimmen kann. Weiter konnte man feststellen, daß der Luftsauerstoff eine starke Einwirkung auf das photochemische Reaktionsprodukt

[4]) Nachr. Ges. Wiss. Göttingen 1926, Math. Phys. Klasse 175.

[5]) Hentschel u. Schindel, Klin. Ws. 9, 262 (1930).

hat. Die bei Anwesenheit von Sauerstoff dargestellten Präparate besaßen zwar auch eine antirachitische Wirkung, doch zeigte die Analyse, daß eine Sauerstoffaufnahme stattgefunden hatte. Windaus und seine Mitarbeiter[6]) kamen dann zu dem Ergebnis, daß es gelingt, antirachitisch wirksame Produkte herzustellen, die die gleiche analytische Zusammensetzung wie die Muttersubstanz besitzen, wenn man sowohl bei der Bestrahlung als bei der Aufarbeitung des Reaktionsproduktes den Luftsauerstoff peinlich ausschließt. Die rohen Bestrahlungsprodukte nehmen an der Luft außerordentlich rasch Sauerstoff auf, wobei die antirachitische Wirkung nach und nach verloren geht. Die unter geeigneten Vorsichtsmaßnahmen dargestellten Präparate zeigen bei gleicher analytischer Zusammensetzung auch noch das gleiche Molekulargewicht wie das Ergosterin. Die Hydroxylgruppe ist noch vorhanden und durch Benzopersäuretitration und quantitative katalytische Hydrierung lassen sich auch noch Doppelbindungen nachweisen. Der Vorgang bei der Bestrahlung besteht also nicht, wie man es sonst häufig bei photochemischen Reaktionen findet, in einer Polymerisation, es hat irgend eine Isomerisierung des Ergosterins stattgefunden, die man zunächst durch Wanderung der Doppelbindungen oder durch cis-trans-Umlagerungen zu erklären suchte. Weiter wurde festgestellt, daß die photochemische Reaktion nicht reversibel ist. Ein ergosterin-freies Bestrahlungsprodukt konnte nicht durch erneute Bestrahlung in Ergosterin zurückverwandelt werden; es findet eine andersartige photochemische Reaktion statt. Durch längere Einwirkung des ultravioletten Lichts geht die antirachitische Wirkung wieder verloren[7]). Aus einem solchen „Überstrahlungsprodukt" gelang es Windaus und seinen Mitarbeitern[8]), die ersten kristallinen photochemischen Umwandlungsprodukte des Ergosterins, die beiden sog. Suprasterine, zu fassen. Diese Stoffe, Isomere des Ergosterins, stellen die Endprodukte der photochemischen Reaktion des Ergosterins dar, sie lassen sich nicht weiter verwandeln oder ineinander überführen. Aus den Änderungen der optischen Eigenschaften, Drehung und Ultraviolettspektrum, und der physiologischen Wirksamkeit im Laufe der Bestrahlung und bei Variationen der Wellenlänge des angewandten Lichts kam Windaus zu dem Schluß, daß die photochemische Reaktion nicht einfach in einem Übergang Ergosterin—Vitamin bestehen kann, sondern daß aus dem Ergosterin nach- oder nebeneinander außer dem Vitamin

6) Windaus u. Linsert, A. 465, 148 (1928). Windaus, Nachr. Ges. Wiss. 1920. Math. Phys. Kl. 36. S. a. Windaus c. s., A. 489, 252 (1931).
7) Rosenheim u. Webster, Lancet 213, 622 (1927).
8) Windaus c. s., A. 483, 17 (1930).

und den Suprasterinen noch mehrere andere Bestrahlungsprodukte entstehen müssen, von denen vielleicht nur ein Stoff die antirachitische Wirkung bedingt.

Eine Komplikation ergab sich noch, als man eine neuartige physiologische Wirkung des Bestrahlungsproduktes kennen lernte[9]). Bei starker Überdosierung, die das 3—5000fache der antirachitischen Dosis beträgt, verursacht das Produkt typische Giftwirkungen. Der Kalk- und Phosphatgehalt des Bluts steigt an, und gleichzeitig verarmt das Knochengerüst an Kalksalzen. Es kommt zu Kalkablagerungen in den Arterien, Lungen, Nieren und im Magen, die von einer Gewichtsabnahme der Versuchstiere begleitet sind und schließlich zum Tode führen. Die Bestimmung der Giftgrenzdosis erfolgt an Mäusen[10]). Die Giftgrenzdosis stellt die Menge eines Präparats dar, die bei vier ausgewachsenen Mäusen im Gewicht von über 16 g, in 12 Tagen 10mal verabreicht, entweder die Tiere tötet oder eine Gewichtsabnahme von 2,5 g und mehr hervorruft, wobei die Mehrzahl der Mäuse in den Nieren Kalkablagerungen haben soll.

Damit erhob sich nun die Frage, handelt es sich hier um eine Wirkung, die das Vitamin selbst in höheren Dosen zeigt, also um eine Hypervitaminose, oder sind in dem Gemisch der Bestrahlungsprodukte Begleitstoffe vorhanden, die allein diese toxische Wirkung bedingen? Grade die letzte Ansicht wurde von verschiedenen Forschern[11]) vertreten, die behaupteten, durch Bestrahlung mit geeigneten Filtern Produkte bekommen zu haben, die frei von der toxischen Wirkung seien.

Diese Frage hat sich erst einwandfrei entscheiden lassen, als es im Jahre 1931 gelang, verschiedene antirachitisch wirksame Kristallisate aus dem Bestrahlungsgemisch zu isolieren. Reering und van Wijk[12]) isolierten einen sehr luftempfindlichen niedrigschmelzenden Stoff, die sog. Substanz L. Englischen Forschern[13]) gelang es durch Hochvakuumdestillation und fraktionierte Kondensation aus Bestrahlungsprodukten, eine kristallisierte Substanz, die sie Calciferol nannten, zu isolieren. Ein drittes Produkt, das Vitamin D_1, konnten Windaus und seine Mitarbeiter[14]) in kristallisierter Form erhalten, nachdem sie durch Addition

[9]) Kreitmair u. Moll, Münchner Med. Ws. 75, 637 (1928).

[10]) Holtz, Laquer, Kreitmair u. Moll, Bio. Z. 237, 247 (1931).

[11]) Kisch u. Reiter, D. Md. Ws. 56, 2034 (1930).

[12]) Biochem. J. 23, 1294 (1929); 25, 1001 (1931).

[13]) Angus, Askew, Bourdillon, Bruce, Callow, Fischmann, Philpot u. Webster, Proc. Roy. Soc. B. 108, 340 (1931).

[14]) A. 489, 252 (1931).

von Maleinsäureanhydrid und Abtrennung der alkali-löslichen Säuren kristallisationshemmende Begleitstoffe entfernt hatten. Schließlich wurde von Windaus, Linsert und Mitarbeitern[15]) noch ein viertes Kristallisat, das Vitamin D_2, erhalten. Dieser letzte Stoff hat sich als das reine, einheitliche antirachitische Vitamin aus dem Ergosterin erwiesen. Die anderen Substanzen enthalten ihn in mehr oder minder großer Menge. Die Substanz L ist nach Windaus[15]) nur ein verunreinigtes Vitamin D_1. Vitamin D_1 ist eine definierte Molekülverbindung, die das Vitamin und einen zweiten Stoff (Lumisterin) im Verhältnis 1 : 1 enthält. Das zuerst von den englischen Forschern erhaltene Calciferol ist ein Gemisch von Vitamin D_1 und von Anlagerungsverbindungen des Vitamins mit seinen thermischen Umlagerungsprodukten. Die englischen Forscher haben dem reinen Vitamin, das sie aus diesem Gemisch isolieren konnten, ebenfalls den Namen Calciferol gegeben und unter diesem Namen versteht man in der englischen Literatur jetzt nur noch das Vitamin D. (Die Bez. Vitamin D_2 ist zweckmäßig durch Vitamin D aus Ergosterin zu ersetzen.)

Außer dem Vitamin D und den beiden Suprasterinen wurden dann noch zwei Stoffe gefaßt: das Lumisterin[17]), die zweite Komponente des Vitamin D_1, und das Tachysterin[18]). Das Tachysterin addiert sehr rasch Maleinsäureanhydrid und Citraconsäureanhydrid. Aus seinem Anlagerungsprodukt mit Citraconsäureanhydrid kann man es durch thermische Spaltung wiedergewinnen, doch ist es noch nicht in kristallisierter Form gefaßt worden. Das Tachysterin ist sehr leicht autoxydabel und auf seiner Anwesenheit beruht die leichte Oxydierbarkeit der rohen Bestrahlungsprodukte. Das reine Vitamin D ist relativ luftbeständig. Bei der Weiterbestrahlung des Vitamins bilden sich die beiden Suprasterine; daneben entsteht ein Stoff, den man noch nicht kristallin erhalten hat, der seine Anwesenheit durch ein Ultraviolettabsorptionsspektrum mit einem Maximum bei 248 mμ verrät. Wegen seiner toxischen Wirkung nennt man ihn Toxisterin[19]).

Von den sechs nachgewiesenen photochemischen Umwandlungsprodukten des Ergosterin zeigt nur eines, das Vitamin D oder Calciferol, die

15) A. 492, 226 (1932).

16) Proc. Roy. Soc. B. 109, 488 (1932).

17) Windaus c. s., A. 493, 259 (1932).

18) Windaus, v. Werder u. Lüttringhaus, A. 499, 188 (1932).

19) Laquer u. Linsert, Klin. Ws. 1933, 753. Windaus, Lüttringhaus u. Busse, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen 1932, Math. Phys. Kl. III. 150.

antirachitische Wirkung. Es ist im Schutzversuch an der Ratte zu 0,015 und 0,02 γ täglich voll wirksam (1 mg = 40 000 internationale Einheiten). In höheren Dosen zeigt es auch die Giftwirkung: die toxische Grenzdosis liegt zwischen 0,05 und 0,075 mg bei der Maus. Die toxische Wirkung allein zeigen das Tachysterin und das Toxisterin. Diese Tatsache läßt die Verwendung des reinen kristallisierten Vitamins als Heilmittel wünschenswert erscheinen[20]), da bei ihm der therapeutische Index, d. h. das Verhältnis von antirachitischer Grenzdosis an der Ratte zu der toxischen Grenzdosis an der Maus am günstigsten wie 1 : 3500 liegt. In den rohen Bestrahlungsprodukten befinden sich noch unkontrollierbare Mengen von den toxischen Begleitstoffen, die den Index ungünstig beeinflussen. Außerdem hat das kristallisierte Produkt den Vorzug der bequemen Dosierbarkeit. Von der Eigenschaft des Tachysterins und des Toxisterins, den Calciumgehalt des Blutes zu erhöhen, hat man auch praktischen Gebrauch gemacht. Auf Vorschlag von Holtz[21]) werden Derivate dieser Stoffe unter der Bezeichnung A.T. 10 zur Behandlung der postoperativen und idiopathischen Tetanie anstelle des kostbaren Colliphormons verwendet; mit ihnen sind sehr gute Erfolge erzielt worden.

E IV. Darstellung und Eigenschaften der Bestrahlungsprodukte aus Ergosterin

E IV a. Vitamin D aus Ergosterin. 25 g Ergosterin werden in 500 ccm reinem Benzol gelöst und in einer Quarzhohlwalze mit dem Magnesiumfunken bestrahlt. Die Quarzwalze, die durch einen kleinen Motor in langsame Rotation versetzt wird, umgibt die Magnesiumbleche, zwischen denen der Funke überspringt. Zur Erzeugung des Funkens wird Drehstrom von 260 Volt (Stromstärke auf der Primärseite 4 Ampère) in einem Hochspannungstransformator auf 10 000 Volt gebracht. Ein kräftiger Ventilator bläst durch den Hohlraum der Walze, um die Lösung zu kühlen und das gebildete Magnesiumoxyd zu entfernen.

Im Laufe von 12 Stunden lassen sich so etwa 60 Proz. des Ergosterins photochemisch umwandeln. Die Aufarbeitung muß unter peinlichem Luftausschluß durchgeführt werden. Hierzu werden alle Operationen unter Durchleiten von Kohlendioxyd, das erst einen Chromo-chlorid-turm passiert hat, oder von Wasserstoff durchgeführt. Alle Lösungsmittel müssen ausgekocht sein und im Kohlendioxyd-strom erkaltet sein.

Das Benzol wird unter vermindertem Druck bei ca. 30—40° abgedampft. Der Rückstand wird mit heißem Methylalkohol (500 ccm) digeriert, wobei das unveränderte Ergosterin sich als Kristallbrei abscheidet. Durch

[20]) Windaus u. Lüttringhaus, D. med. Ws. 1932, Nr. 43.
[21]) Merck's Jb. 47, 20 (1934).

Abkühlung auf — 16° vervollständigt man die Kristallisation des Ergosterins und filtriert ab. Zur Entfernung des restlichen Ergosterins wird die Lösung mit einer methylalkoholischen Lösung von 3 g Digitonin versetzt und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit 650 ccm niedrigsiedendem Petroläther ausgekocht. Ergosterin-digitonid und überschüssiges Digitonin bleiben ungelöst und werden filtriert. Die Petrolätherlösung, die die Bestrahlungsprodukte enthält, wird auf ca. 50 ccm eingeengt und mit 7,5 g Citraconsäureanhydrid versetzt. Zu dem Gemisch gibt man soviel abs. peroxydfreien Äther, bis eine homogene Lösung entstanden ist. Die Mischung wird unter Luftabschluß, am besten im zugeschmolzenen Rohr, 5 Tage bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen. Nach dieser Zeit wird die Lösung unter vermindertem Druck eingedampft und der Rückstand in 120 ccm 10proz. methylalkoholischer Kalilauge gelöst. Die Lösung bleibt 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und wird dann mit Wasser versetzt und dreimal mit Petroläther ausgeschüttelt. In der wäßrig-methylalkoholischen Lösung sind die Produkte enthalten, die sich leicht mit Citraconsäureanhydrid umsetzen. Aus dieser Lösung läßt sich, wie weiter unten beschrieben wird, das Tachysterin als Citraconsäure-addukt gewinnen. Die vitaminhaltige Petrolätherlösung wird gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird in wenig heißem Aceton gelöst und bei + 4° aufbewahrt. Es setzt dann mehr oder minder schnell Kristallisation ein, die nach einigen Tagen vollständig ist. Das so gewonnene rohe Vitamin D wird durch Kristallisation aus Aceton-Methylalkohol gereinigt.

Das Vitamin D bildet schöne lange Prismen vom Schmp. 115/16°. Es ist in Äther, Chloroform, Essigester und Benzol sehr leicht, in Petroläther und Alkohol leicht, in Methylalkohol schwerer löslich. 14 Teile Aceton lösen 1 Teil Vitamin bei + 7°. In Wasser ist es unlöslich, leicht löslich in Fetten und Ölen. Es dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts, auffallend ist der große Unterschied der Drehung in Alkohol und in Normalbenzin:

in Alkohol $[\alpha]_D = +103°$ $[\alpha]_{5461} = +124°$.
in Benzin $[\alpha]_D = +35{,}3°$ $[\alpha]_{5461} = +39{,}5°$.

Das Ultraviolettspektrum zeigt ein ausgeprägtes Maximum bei 265 mμ (s. Figur auf Seite 293).

Die Farbreaktionen des Vitamins sind weniger ausgeprägt als die des Ergosterins. Mit Chloralhydrat entsteht eine hellbraune Schmelze. Die Farbreaktionen nach Tortelli-Jaffé und nach Liebermann-Burchard sind etwa vier- bis fünfmal schwächer als die des Ergosterins.

Ein charakteristisches Derivat, das sich auch zur Abscheidung des Vitamins aus dem rohen Bestrahlungsprodukt eignet, ist der 3,5-Dinitrobenzoesäureester. Darst. durch Umsetzung des Vitamins mit Dinitro-benzoylchlorid in Pyridin. Aus Aceton oder Chloroform-Alkohol dunkelgelbe Prismen vom Schmp. 148/49°. Windaus, Linsert, Lüttringhaus u. Weidlich, A. 492, 226 (1932).

E IV b. Darstellung des Lumisterins

Zur Gewinnung des Lumisterins isoliert man zunächst aus dem Bestrahlungsprodukt seine Anlagerungsverbindung mit dem Vitamin D, die bei

ihrer ersten Isolierung als Vitamin D_1 bezeichnet wurde. Die Ausbeute an dieser Anlagerungsverbindung wird durch die Verwendung einer Wellenlänge des ultravioletten Lichtes über 280 mμ sehr begünstigt. Man wählte daher mit Vorteil, wenn man eine Quecksilberlampe als Lichtquelle benutzt, das Reaktionsgefäß aus Uviolglas, das die kürzeren Wellen schwächt oder ganz zurückhält. Um große Mengen Ergosterin in einer handlichen Form der Bestrahlung aussetzen zu können, benutzt man eine Apparatur, die von G. Ahrens im Göttinger Laboratorium ausgearbeitet worden ist[1]). Die Apparatur (s. Fig. I) arbeitet nach dem Prinzip Zirkulation durch Temperaturgefälle. Nach Zündung der Quecksilberlampe (einer senkrecht brennenden Lampe von 2000 H. K.) erwärmt sich die Ergosterin-lösung innerhalb der Uviolglas-walze. Sie steigt nach oben und gelangt durch das obere Rohr in den Kühler, wo sie wieder abgekühlt wird. Auf diese Weise kommt eine kontinuierliche Strömung zustande, die die gesamte Lösung immer wieder an der Lichtquelle vorbeiführt. Da man die Dimensionen des Rundkolbens beliebig groß wählen kann (in der benutzten Apparatur ein 5-Liter-Kolben), ist es möglich, sehr große Mengen Ergosterin zu bestrahlen. Bei der Bestrahlung muß der Sauerstoff völlig ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck durchspült man die ganze Apparatur vor der Bestrahlung mit reinem Wasserstoff, evakuiert sie dann und saugt, nachdem der Hahn a geschlossen ist, die Ergosterinlösung hoch, bis sie das Überlaufgefäß zur Hälfte füllt.

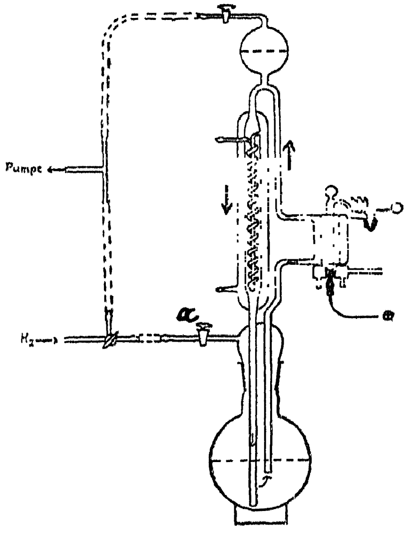


Fig. I.

In dieser Apparatur werden 50 g Ergosterin in einem Gemisch von reinem Benzol und Alkohol 12 Stunden lang bestrahlt. Nach dieser Zeit beträgt die Umwandlung etwa 40%, d. h. 20 g Ergosterin sind photochemisch verändert worden. Die Aufarbeitung wird in der gleichen Weise wie zuvor

[1]) Zu beziehen von der Firma Krannich & Kühn, Göttingen.

beschrieben durchgeführt. Doch kann man meistens, vor allem wenn man im Besitz von Impfkristallen ist, die Addition von Citraconsäureanhydrid umgehen. Der Rückstand der Petroläther-lösung wird in Aceton gelöst und zur Kristallisation gebracht. Das Vitamin D_1 kristallisiert aus Aceton in langen Nadeln vom Schmp. 124/25°, $[\alpha]_D = +140°$ (in Aceton). Die Ausbeute an reinem Vitamin D_1 beträgt 7 bis 8 g.

Zur Zerlegung der Anlagerungsverbindung in ihre Komponenten wird sie durch Erwärmen mit Essigsäureanhydrid auf dem Wasserbade acetyliert. Nach dem Erkalten läßt sich das Lumisterylacetat durch vorsichtigen Zusatz von 70proz. Essigsäure in kristalliner Form ausscheiden, während das Acetat des Vitamin D nach einiger Zeit ölig ausfällt. Die Kristalle werden abgesaugt und aus Aceton-Methanol umkristallisiert. Das Lumisterylacetat bildet derbe Nadeln, die bei 100° schmelzen, $[\alpha]_D = +162{,}8°$ (in Aceton).

Durch Verseifung mit methylalkoholischer Kalilauge gewinnt man aus dem Acetat das freie Lumisterin. Aus Aceton-Methanol feine Nadeln vom Schmp. 118°, $[\alpha]_D = +191{,}5°$ (in Aceton). Die Farbreaktion nach Liebermann-Burchard ist etwa achtmal schwächer als die des Ergosterins. Mit Chloralydrat entsteht eine grünblaue Schmelze.

Lumisterin zeigt bei täglichen Gaben von 0,2 γ keine antirachitische Wirkung und ist in der täglichen Dosis von 0,5 mg bei der Maus ungiftig. Es ist also entweder physiologisch ganz unwirksam oder nur in sehr hohen Dosen wirksam.

Der Beweis, daß in dem Vitamin D_1 tatsächlich eine Anlagerungsverbindung zwischen Lunisterin und Vitamin D vorliegt, konnte durch die Synthese aus den beiden Komponenten erbracht werden. Auch die Zerlegung der Verbindung läßt sich vollständig durchführen: aus den Mutterlaugen des Lumisterylacetats läßt sich das Vitamin D als Dinitro-benzoesäureester gewinnen. Das Zustandsdiagramm der beiden Stoffe zeigt durch ein ausgeprägtes Maximum die Existenz der Verbindung an.

Windaus, Dithmar, Fernholz, A. 493, 259 (1932). G. Ahrens, Dissertation, Göttingen 1933.

E IV c. Darstellung des Tachysterins.

Die wäßrig-methylalkoholischen Lösungen, die bei der Darstellung des Vitamin D nach der Addition von Citraconsäureanhydrid erhalten wurden, werden eingedampft, bis die Hauptmenge des Methylalkohols übergegangen ist. Nach dem Erkalten versetzt man die Lösung mit verdünnter Salzsäure. Das Anlagerungsprodukt scheidet sich in groben amorphen Flocken ab. Es wird abfiltriert, gewaschen und getrocknet. 20 g des Produktes werden mit 75 ccm Essigsäureanhydrid auf dem Wasserbade 2 Stunden erwärmt. Nach Einengen i. V. und Zugabe von 80proz. Essigsäure scheidet sich das Tachysteryl-acetat-citraconsäureanhydrid ab. Es wird aus Eisessig unter Anspritzen mit wenig Wasser umkristallisiert und bildet dann lange Nadeln vom Schmp. 161/62°. Ausbeute 7 g an reinem kristallisiertem Material.

Durch thermische Abspaltung des Citraconsäureanhydrids aus dem Additionsprodukt kann man das freie Tachysterin zunächst als Acetat gewinnen. Die Anlagerungsverbindung wird im Vakuum auf 165° erhitzt, hierbei destilliert das Citraconsäureanhydrid über. Nach Anlegen von Hoch-

vakuum und Steigerung der Temperatur auf 190° läßt sich auch das Tachysterylacetat überdestillieren. Es ist bis jetzt noch nicht in kristalliner Form erhalten worden. Das Gleiche gilt von dem durch Verseifung dargestellten Tachysterin. Mit Citraconsäureanhydrid erhält man aus dem Tachysterylacetat das Additionsprodukt vom Schmp. 161/62° zurück. Ein schön kristallisiertes Derivat des Tachysterins ist der 3,5-Dinitro-4-methyl-benzoesäureester, den man durch Umsetzung von Tachysterin mit dem Säurechlorid in Pyridin erhält. Aus Aceton lange hellgelbe Nadeln vom Schmp. 154/55°. Mit Hilfe dieses Esters kann man auch das Tachysterin unter Umgehung der Citraconsäureanhydrid-addition aus dem rohen Bestrahlungsgemisch isolieren.

Das Tachysterin stellt ein farbloses Öl dar, das in den üblichen organischen Lösungsmitteln außer Methanol leicht löslich ist. In Wasser ist es unlöslich. $[\alpha]_D = -70°$. $[\alpha]_{5461} = -86{,}3°$. Das Ultraviolettabsorptionsspektrum besitzt ein hohes Maximum bei 280 mμ und weitere Banden bei 268 und 294 mμ. Die Farbreaktionen des Tachysterins sind nicht sehr charakteristisch: Liebermann-Burchard über Gelbbraun nach Grün. Mit Chloralhydrat olivgrüne Färbung.

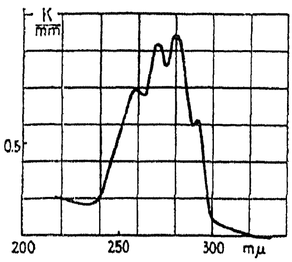
Das Tachysterin ist ungewöhnlich luftempfindlich, seine Anwesenheit bedingt die leichte Autoxydation der rohen Bestrahlungsprodukte. Beim Schütteln der methylalkoholischen Lösung des Tachysterins mit Sauerstoff werden etwa 2 Mol aufgenommen. Es scheidet sich ein amorpher Stoff ab, der aus einer essigsauren Kaliumjodid-lösung Jod frei macht, also das Verhalten eines Peroxyds zeigt.

Das Tachysterin ist in täglichen Dosen von 1 γ an Ratten antirachitisch unwirksam. Es ist also mindestens 50mal weniger wirksam als das Vitamin D. Dagegen zeigt es an der Maus in Dosen zwischen 0,1 und 0,2 mg pro Tag eine deutliche Giftwirkung. Es ist demnach halb so giftig wie das Vitamin D.

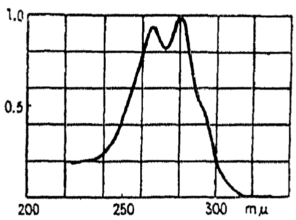
Windaus, v. Werder u. Lüttringhaus, A. 499, 188 (1932).

E IV d. Darstellung der Suprasterine

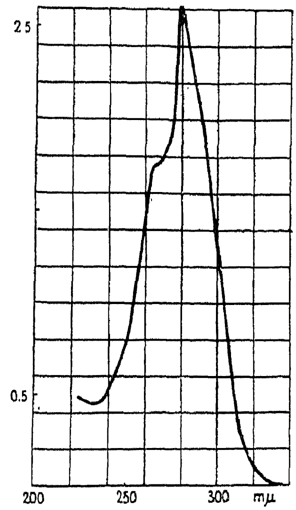
1,5 g Ergosterin werden in einem Uviolglas in 25 ccm Alkohol gelöst. Die alkoholische Lösung wird einige Zeit zum Sieden erhitzt und dann das Rohr zugeschmolzen. Eine Reihe solcher Röhren wird drehbar um eine Quecksilberlampe in einem Abstand von 7,5 cm angebracht. Nach einer Bestrahlungsdauer von 50 Stunden, während der die Temperatur auf etwa 75° in den Röhren steigt, werden die Rohre entleert. Die alkoholische Lösung wird dann mit einer Digitoninlösung versetzt, wobei etwa 4% des Materials ausgefällt werden. Das Digitonid besteht aus Dihydro-ergosteryl-digitonid. Das Dihydroergosterin ist in einem kleinen Prozentsatz im Ergosterin enthalten und wird photochemisch nicht verändert. Das Filtrat des Digitonids wird mit Petroläther ausgeschüttelt. 10 g des Rückstands der Petrolätherlösung werden in 250 ccm trocknem Benzol gelöst. In die Lösung wird unter Eiskühlung im Laufe einer Stunde Cyansäuregas eingeleitet, das durch thermische Zersetzung von 15 g Cyanursäure gewonnen wurde. Das Reaktionsgemisch bleibt 14 Tage sich selbst überlassen. Ein Niederschlag, der sich gebildet hat, wird abfiltriert und das Filtrat i. V. zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit Petroläther digeriert und das Ungelöste mit dem ersten Niederschlag vereinigt. Mit Pyridin kann man aus dem



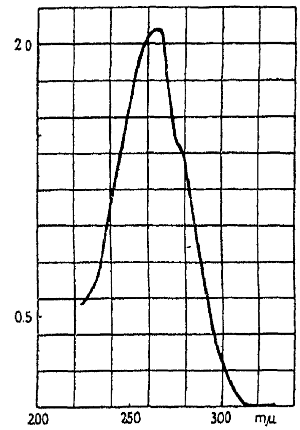
Ergosterin



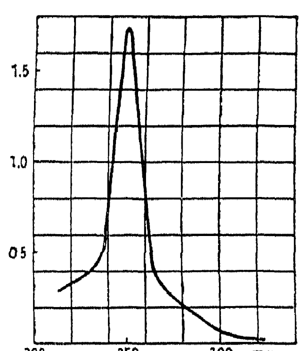
Lumisterin



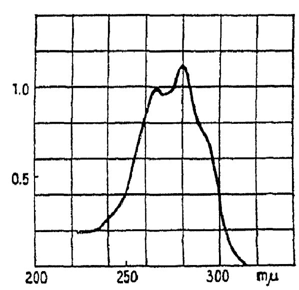
Tachysterin



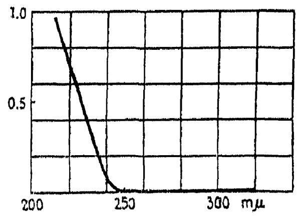
Vitamin D



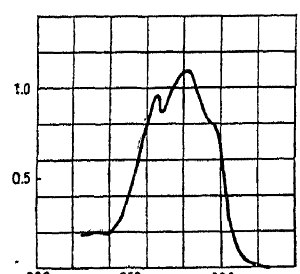
Toxisterin



Iso-pyrovitamin



Suprasterine



Pyrocalciferol

Ultraviolett-Absorptionsspektren des Ergosterins und seiner photochemischen Umwandlungsprodukte

(0,02 %ige Lösungen in Äther oder Normalbenzin).

Niederschlag die Allophanester der Suprasterine extrahieren. Sie werden mit Wasser ausgefällt und nach dem Trocknen aus wenig Essigester umkristallisiert. In der schwerer löslichen Fraktion sammelt sich ein nicht kristallisierter Stoff an, der bei ungefähr 219° schmilzt und ein $[\alpha]_D = -40°$ (Chloroform) zeigt. Dieser Ester stellt das Allophanat des Suprasterins I dar. Aus den Mutterlaugen läßt sich ein leichter löslicher Allophansäureester, der in schönen Nadeln kristallisiert, gewinnen. Er schmilzt bei 224° und zeigt ein $[\alpha]_D = +80°$ (Chloroform). Es ist der Allophanester des Suprasterins II.

Suprasterin I: Darst. durch Verseifung des amorphen Allophanats mit methylalkoholischer Kalilauge. Es wird aus stark gekühltem Aceton in Form von langen Nadeln erhalten, die bei 104° schmelzen. $[\alpha]_D = -76°$ (in Chloroform). Bei der Liebermann-Burchard'schen Farbreaktion färbt es sich olivgrün. Mit Chloralhydrat entsteht eine rotviolette Schmelze. Der Benzoesäureester bildet aus Aceton kristallisiert Blättchen vom Schmp. 96°.

Suprasterin II: Darst. durch Verseifung des kristallisierten Allophanats vom Schmp. 224° mit methylalkoholischer Kalilauge. Aus Aceton oder Methylalkohol umkristallisiert derbe Prismen, die bei 110° schmelzen. $[\alpha]_D = +62{,}9°$ (in Chloroform). Die Farbenreaktionen entsprechen denen des Suprasterins I. Der neutrale Oxalester, darg. durch Umsetzung von Suprasterin II in Pyridin mit Oxalylchlorid, bildet aus Aceton kristallisiert Blättchen vom Schmp. 165°.

Beide Suprasterine zeigen in dem Wellenlängengebiet zwischen 240 und 300 mμ keine Ultraviolettabsorption mehr. Beide Suprasterine zeigen keine antirachitische oder Gift-wirkung.

Windaus c. s., A. 483, 17 (1930).

E V. Die photochemische Reihe der Bestrahlungsprodukte

Nachdem man die Hauptbestandteile des photochemischen Umwandlungsprodukts des Ergosterins in einheitlicher kristalliner Form gefaßt hatte, erschien es von Interesse, den Zusammenhang zwischen den einzelnen Substanzen, ihre photochemische Umwandlung ineinander zu bestimmen. Diese Untersuchungen ergaben folgendes Bild: Das Lumisterin geht bei der Bestrahlung in Tachysterin und Vitamin D über. Auch das Tachysterin läßt sich weiter in das Vitamin D verwandeln. Die beiden Stoffe stellen also ebenso wie das Ergosterin zwei „Provitamine" dar. Das Vitamin selbst geht bei weiterer Bestrahlung in die beiden Suprasterine über. Daneben bildet sich das schon oben erwähnte Toxisterin, das aber noch nicht in einheitlicher kristallisierter Form gefaßt worden ist. Die beiden Suprasterine werden photochemisch nicht weiter verwandelt, sie lassen sich auch nicht wechselseitig ineinander verwandeln. Sie stellen also die Endstufen der photochemischen Reihe der Bestrahlungsprodukte des Ergosterins dar, eine Tatsache, die verständ-

lich ist, da in ihnen das Ultraviolettspektrum in dem Wellenlängengebiet, das zur Bestrahlung verwendet wird, völlig abgebaut ist, so daß dem Licht die Möglichkeit eines Eingriffs genommen ist. Die beiden Suprasterine bilden sich also nebeneinander, doch muß die Frage, ob sie direkt aus dem Vitamin D entstehen oder ob das Toxisterin ihre Muttersubstanz ist, noch solange offen bleiben, bis einmal das Toxisterin in reiner Form gewonnen ist. Diese bisherigen Erfahrungen führen zu der folgenden photochemischen Reihe[1]):

Ergosterin-Lumisterin-Tachysterin-Vitamin-D- Toxisterin / Suprasterin I / Suprasterin II.

Doch ist die Reihe noch nicht ganz vollständig. Durch eine Arbeit von Windaus u. Auhagen[2]) ist ein weiteres Bestrahlungsprodukt auf indirektem Wege erkannt worden. Die Forscher fanden, daß frisch hergestellte Bestrahlungsprodukte, die im Hochvakuum luftfrei eingeschmolzen waren, bei Zimmertemperatur im Laufe von Tagen, bei 55° in Stunden ihr Ultraviolettspektrum änderten, und zwar machte sich ein Anstieg der Absorption bei 280 mμ bemerkbar, also in dem Gebiet der Absorption des Tachysterins, ohne daß eine Änderung der physiologischen Wirksamkeit festzustellen war. Windaus nimmt daher an, daß in den Bestrahlungsprodukten noch eine unbekannte Vorstufe, ein „Pro-tachysterin", vorhanden sei, das in einer Dunkelreaktion in das Tachysterin übergeht. Welche Rolle dieser Stoff als Zwischenprodukt bei dem photochemischen Prozeß spielt, ist noch nicht aufgeklärt.

Die oben aufgestellte Reihe ist durch die Bestrahlung der einzelnen kristallisierten Zwischenprodukte ermittelt worden, an ihrer Richtigkeit unter diesen Bedingungen kann kein Zweifel sein. Aber vielleicht gibt sie doch nicht das wahre Bild von dem Vorgang, der sich bei der Bestrahlung des Ergosterins abspielt. Nach dieser Reihe würde das Vitamin D als das dritte Umwandlungsprodukt des Ergosterins erscheinen, wenn wir das Pro-tachysterin mit einbeziehen sogar als viertes. Aber Präparate, die nur durch kurze Bestrahlung des Ergosterins dargestellt sind, zeigen schon eine antirachitische Wirksamkeit, die nahezu mit der von länger bestrahlten übereinstimmt[3]), sie enthalten also prozentual gleich viel Vitamin D. Nach der angegebenen Reihe sollte man aber mit einem langsamen Anstieg der physiologischen Wirksamkeit über die unwirksamen Vorstufen Lumisterin und Tachysterin rechnen. Vielleicht

[1]) Windaus c. s., A. 499, 188 (1932).
[2]) H. 196, 108 (1931).
[3]) Bills, J. Biol. Chem. 80, 557 (1928).

ist aus diesem Grunde an die Stelle des Nacheinander der Entstehung ein Nebeneinander zu setzen, vielleicht so wie es in der folgenden Reihe angegeben ist:

$$\text{Ergosterin} \begin{array}{l} \nearrow \text{Lumisterin} \searrow \\ \searrow \text{(Protachysterin)} \nearrow \\ \quad \text{Tachysterin} \end{array} \text{Vitamin D.}$$

Bei der Bestrahlung mit langwelligem Licht kann der obere Weg über das Lumisterin bevorzugt sein, während das kurzwellige Ultraviolett den unteren über Tachysterin einschlägt[4]).

E VI. Die Konstitution der Bestrahlungsprodukte des Ergosterins

Die Kenntnisse, die wir von dem Aufbau der einzelnen Produkte haben, die durch Einwirkung des Lichts auf Ergosterin entstehen, sollen in der Reihenfolge besprochen werden, die der photochemischen Reihe der Stoffe entspricht.

E VI a. Das Lumisterin

Die Zusammensetzung des Lumisterins ist durch Analysen und Molekulargewichtsbestimmungen sicher zu $C_{28}H_{44}O$ festgelegt. Es ist also mit dem Ergosterin isomer und zeigt auch in seinem chemischen Verhalten weitgehende Analogie zu seiner Muttersubstanz. Wie die Darstellung einer Reihe von Estern beweist, enthält es eine Hydroxylgruppe. Durch Benzopersäuretitration und durch quantitative Bestimmung der Wasserstoffaufnahme bei der katalytischen Hydrierung lassen sich drei Doppelbindungen im Lumisterin nachweisen[1]). Davon liegt eine ebenso wie im Ergosterin in der Seitenkette zwischen C-Atom 22 und 23, denn bei der Ozonisierung des Lumisterins konnte der Methyl-isopropyl-acetaldehyd erhalten werden, der durch die Abspaltung der C-Atome 23 bis 28 entsteht[2]). Die beiden anderen Doppelbindungen sind konjugiert und bedingen dadurch ein Ultraviolettabsorptionsspektrum, das dem des Ergosterins ähnelt. In Übereinstimmung damit läßt sich das Lumisterin mit Natrium und Alkohol hydrieren und geht in ein Dihydroderivat über, das, wie die quantitative Messung der Wasserstoffaufnahme zeigt, noch

[4]) Setz, H. 213, 183 (1933).

[1]) Windaus, Dithmar u. Fernholz, A. 493, 259 (1932). Dimroth, B. 68, 539 (1935).

[2]) Guiteras, A. 494, 117 (1932).

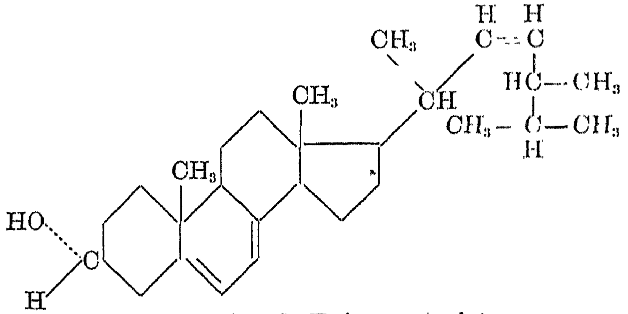
zwei Doppelbindungen enthält[1]). Die beiden konjugierten Doppelbindungen des Lumisterins dürften in einem Ring liegen, denn bei der Salpetersäureoxydation erhält man ebenso wie aus Ergosterin die Methyl-benzol-tetracarbonsäure[3]). Auch das Grundskelett des Lumisterins ist mit dem des Ergosterins identisch: durch Selendehydrierung entsteht aus dem Lumisterin der Kohlenwasserstoff $C_{18}H_{16}$, das γ-Methyl-cyclopenteno-phenanthren[1]).

Nur in zwei Eigenschaften unterscheidet sich das Lumisterin von Ergosterin: Es bildet ebenso wie seine Hydrierungsprodukte keine schwerlösliche Anlagerungsverbindung mit Digitonin und liefert bei der Behandlung mit Eosin im Licht kein dimolekulares Dehydrierungsprodukt. Die erste Eigenschaft teilt das Lumisterin mit den sog. Epiderivaten, also etwa dem Epi-koprosterin oder dem Epi-cholestanol. Ebenso wie diese lassen sich seine Hydrierungsprodukte durch Erhitzen mit Natriumäthylat bei höherer Temperatur in Stoffe umlagern, die die umgekehrte räumliche Lage der Hydroxylgruppe besitzen und mit Digitonin eine Anlagerungsverbindung bilden. Man könnte danach die Annahme machen, daß das Lumisterin nach seinen sonstigen Analogien im chemischen Verhalten nur das Derivat des Ergosterins darstellt, das die Hydroxylgruppe in der räumlich entgegengesetzten Lage trägt. Das Lumisterin wäre danach als ein Epi-ergosterin anzusehen. Hiergegen spricht jedoch der Befund, daß das Hexahydrolumisterin[4]), das durch Hydrierung des Dihydro-lumisterins entsteht, weder mit dem Epi-ergostanol, noch mit dem Ergostanol identisch ist. Wenn der Unterschied zwischen Lumisterin und Ergosterin nur in der verschiedenen räumlichen Lage der Hydroxylgruppe bestünde, sollte man nach Hydrierung der Doppelbindungen die Entstehung von Epi-ergostanol erwarten; doch läßt sich zunächst die Annahme nicht ausschließen, daß die andere räumliche Lage der Hydroxylgruppe die Addition von Wasserstoff an die Doppelbindungen so leitet, daß Derivate des cis-Dekalins entstehen. Im Hexahydro-lumisterin könnte also ein Stoff vorliegen, der einem Homologen des Epikoprosterins entspricht. Ein derartiger Stoff ist aus dem Ergosterin bis jetzt noch nicht dargestellt worden, so daß die Möglichkeit zur Prüfung dieser Annahme fehlt. Jedenfalls ist bis heute sicher bewiesen, daß das Licht bei der Bildung des Lumisterins noch keine strukturellen Änderungen im Ergosterinskelett hervorgerufen hat; nach der großen Ähnlichkeit in den meisten Reaktionen des Ergosterins und Lumi-

[3]) Inhoffen, A. 494, 122 (1932).

[4]) Ahrens, Fernholz u. Stoll, A. 500, 109 (1932).

sterins unterscheiden sie sich wahrscheinlich nur durch die verschiedene sterische Anordnung eines Substituenten an einem asymmetrischen C-Atom.



Lumisterin (als Epi-ergosterin)

Dihydrolumisterin $C_{28}H_{46}O$ aus Alkohol Nadeln vom Schmp. 138/39°. Epi-dihydrolumisterin: darg. durch Erhitzen von Dihydrolumisterin mit Natriumäthylat auf 200°. Nadeln vom Schmp. 140°. Liefert mit Digitonin eine Anlagerungsverbindung. Bildet mit dem Dihydrolumisterin eine Anlagerungsverbindung vom Schmp. 186°. Hexahydrolumisterin: Darst. durch Hydrierung von Dihydrolumisterin mit Platin und Wasserstoff in Eisessig. Aus Alkohol Nadeln vom Schmp. 127°. $[\alpha]_D = +9{,}5°$ (Chloroform). Acetat: Schmp. 69°. Epi-hexahydrolumisterin: Darst. durch Aethylatumlagerung des Hexahydrolumisterins. Schmp. unscharf zwischen 86 und 95°. $[\alpha]_D = +10{,}2°$. Acetat: Schmp. 64/65°. Der freie Alkohol ist mit Digitonin fällbar. Isolumisterin: Entsteht durch Behandlung von Lumisterin mit Chlorwasserstoffgas. Nadeln vom Schmp. 138°. $[\alpha]_D = -125°$.

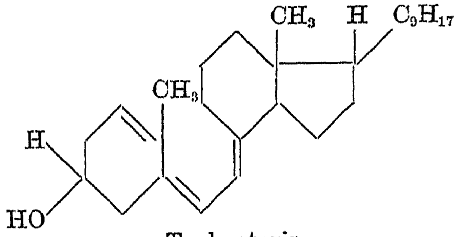
E VI b. Das Tachysterin

Das Tachysterin ist nach der Analyse seiner kristallisierten Derivate, des 3,5-Dinitro-4-methyl-benzoesäureesters und des Additionsprodukts von Citraconsäureanhydrid an Tachysterylacetat ein Isomeres des Ergosterins, es hat also die Zusammensetzung $C_{28}H_{44}O$[5]). Durch die Darstellung der erwähnten Ester ist eine Hydroxylgruppe nachgewiesen. Zur Bestimmung der Zahl seiner Doppelbindungen eignet sich das Tachysterin selbst nicht, da die aus ihm dargestellten Hydrierungsprodukte keine Kristallisationstendenz zeigen; eine quantitative Bestimmung der Wasserstoffaufnahme ist noch nicht durchgeführt worden. Bei der Benzopersäuretitration erhält man schwankende Zahlen; das Tachysterin verbraucht 4—5 Atome Sauerstoff, sein Ester zwischen 3 und 4. Eine Untersuchung an dem Citraconsäure-addukt brachte das Ergebnis, daß im Tachysterin vier Doppelbindungen vorhanden sind[6]): Durch die Addition von Citraconsäureanhydrid an das Tachysterin ist eine der vor-

[5]) Windaus, v. Werder u. Lüttringhaus, A. 499, 188 (1932).
[6]) Lettré, A. 511, 283 (1934).

handenen Doppelbindungen abgesättigt worden. Durch katalytische Hydrierung ließen sich noch zwei Mol Wasserstoff addieren; man kommt zum Tetrahydro-tachysterylacetat-citraconsäureanhydrid. In diesem konnte durch Benzopersäuretitration noch die vierte Doppelbindung nachgewiesen werden.

Das Tachysterin enthält also vier Doppelbindungen. Seiner Zusammensetzung $C_{28}H_{44}O$ nach zeigt es einem Paraffinalkohol mit der gleichen Zahl von C-Atomen $C_{28}H_{58}O$ gegenüber ein Defizit von 14 Wasserstoffatomen. Diese Differenz verteilt sich auf vier Doppelbindungen, die acht beanspruchen und nur der Rest von sechs Wasserstoffatomen entfällt auf Kohlenstoffringe, von denen somit nur noch drei vorhanden sein können. Der photochemische Übergang von Ergosterin oder Lumisterin in Tachysterin besteht also in der Umlagerung eines Stoffes mit vier Ringen und drei Doppelbindungen in einen solchen mit drei Ringen und vier Doppelbindungen. Hierzu muß in dem Molekül des Ergosterins an irgendeiner Stelle eine C—C-Bindung gesprengt werden und dafür eine neue Doppelbindung entstehen. Für den Ort der Aufspaltung gewinnt man vom Tachysterin aus keinen Anhalt, doch lassen sich die folgenden Untersuchungen am Vitamin D auf das Tachysterin übertragen. Die beiden Stoffe lassen sich nämlich durch Hydrierung mit Natrium und Alkohol in verschiedenem Prozentsatz in die gleiche Substanz $C_{28}H_{46}O$ verwandeln[7]), sie müssen also das gleiche Kohlenstoffskelett enthalten. Durch die Untersuchungen am Vitamin D ist die Aufspaltung zwischen C-Atom 9 und 10 sehr wahrscheinlich gemacht worden. Von den vier Doppelbindungen des Tachysterins liegt eine in der Seitenkette zwischen C-Atom 22 und 23, da man aus den Ozonisierungsprodukten den Methyl-isopropyl-acetaldehyd erhält[8]). Die übrigen Doppelbindungen sind sehr wahrscheinlich konjugiert, hierfür spricht das langwellige und hohe Absorptionsspektrum des Tachysterins. Aus diesen Befunden heraus läßt sich die folgende Formel für das Tachysterin als wahrscheinlich angeben:



Tachysterin

[7]) v. Werder, unveröffentlicht.

[8]) A. 494, 117 (1932).

Dihydro-tachysterylacetat-citraconsäureanhydrid: entsteht durch Hydrierung des Citraconsäureanhydrid-adduktes des Tachysterins mit Palladium und Wasserstoff in Essigester. Nadeln vom Schmp. 155—56°, $[\alpha]_D = +79,7°$ (Chloroform). Liefert bei der Ozonisierung nicht mehr den Aldehyd aus der Seitenkette, an dieser Stelle hat sich demnach das erste Molekül Wasserstoff angelagert. Durch thermische Zersetzung entsteht hieraus unter Abspaltung von Citraconsäureanhydrid ein Stoff, dessen Spektrum ganz dem des Tachysterins entspricht, das 22-Dihydro-tachysterin, das noch nicht kristallin erhalten wurde (unveröffentlichte Versuche Windaus und Lüttringhaus). Tetrahydro-tachysteryl-acetat-citraconsäureanhydrid: Entsteht durch Hydrierung des Dihydro-derivats mit Platin und Wasserstoff in Eisessig-Essigester. Blättchen vom Schmp. 134—35°. Verbraucht bei der Benzopersäuretitration 0,9 bis 1,1 Atome Sauerstoff. Der Anhydridring läßt sich durch Alkalien anscheinend sehr schwer aufspalten. Spaltet beim Erhitzen kein Citraconsäureanhydrid ab.

E VI c. Das Vitamin D

Ebenso wie die anderen Bestrahlungsprodukte ist das Vitamin D isomer mit dem Ergosterin, es hat also die Zusammensetzung $C_{28}H_{44}O$[9]). Es enthält eine veresterbare Hydroxylgruppe und wie das Tachysterin vier Doppelbindungen. Diese lassen sich durch die Benzopersäuretitration nicht erfassen; sie zeigt nur drei Doppelbindungen an. Dagegen lassen sich durch die quantitative Bestimmung der Wasserstoffaufnahme bei der katalytischen Hydrierung vier Doppelbindungen nachweisen[10]). Durch Hydrierung mit Natrium und Alkohol entstehen aus dem Vitamin zwei Dihydro-derivate von der Zusammensetzung $C_{28}H_{46}O$. Das als Dihydrovitamin I bezeichnete Produkt entsteht in größerer Menge und läßt sich als Allophansäure-ester aus dem Gemisch abscheiden[9]). Es ist das gleiche Produkt, das auch durch Hydrierung des Tachysterins entsteht. Das Dihydrovitamin verbraucht bei der Benzopersäuretitration drei Atome Sauerstoff und präparativ kann man aus seinem Allophanat durch Einwirkung des gleichen Oxydationsmittels ein schön kristallisiertes Tri-oxyd gewinnen[11]). Die Refraktionsmessungen, die v. Auwers und Wolter[12]) durchgeführt haben, lassen sich auch am besten mit dem Vorhandensein von drei Doppelbindungen deuten[13]). Das zweite Dihydroderivat, das Dihydrovitamin II, ist bis jetzt nur in Form seines Dinitro-benzoats kristallin erhalten worden, der freie

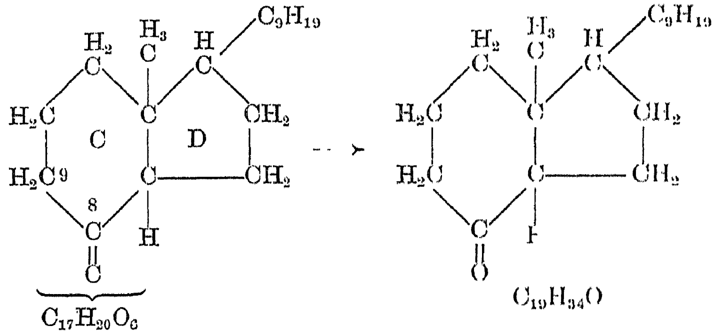
[9]) A. 492, 226 (1932). Windaus, v. Werder u. Gschaider, B. 65, 1106 (1932).
[10]) Kuhn u. Möller, Z. f. angew. Ch. 47, 145 (1934).
[11]) Unveröffentlichte Vers. von Windaus u. S. v. Reichel.
[12]) Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math. Phys. Klasse 1931, 111.
[13]) M. Müller, H. S. 233, 223 (1935).

Alkohol kristallisiert nicht. Der Dinitro-benzoesäureester verbraucht bei der Benzopersäuretitration drei Atome Sauerstoff[14]). Das Vitamin D geht also durch Aufnahme von einem Mol Wasserstoff in zwei Dihydroderivate über, in denen sich drei Doppelbindungen nachweisen lassen. Das Vitamin selbst muß danach vier Doppelbindungen besitzen und nach seiner analytischen Zusammensetzung kann es dann nur noch drei Ringe enthalten[15]). Vom Tachysterin, mit dem es strukturell identisch ist, unterscheidet es sich durch die Lage der Doppelbindungen. Eine der Doppelbindungen bleibt wie bei allen Bestrahlungsprodukten des Ergosterins in der Seitenkette des Moleküls, da durch Ozonabbau der Methyl-isopropyl-acetaldehyd entsteht[16]).

Windaus und Thiele[17]) ist es gelungen, aus Derivaten des Vitamins Abbauprodukte zu gewinnen, die einen Einblick in den Aufbau des Kohlenstoffskeletts gestatten. Das Vitamin-acetat wurde mit Maleinsäureanhydrid in Reaktion gebracht und aus dem entstandenen Additionsprodukt der Vitamin-acetat-maleinsäure-dimethylester dargestellt. Man erhält hierbei zwei Isomere, die wahrscheinlich strukturidentisch, aber stereoisomer sind, da sie sich bei dem weiteren Abbau gleich verhalten. Zunächst wurde durch Hydrierung mit Palladium und Wasserstoff eine Doppelbindung in dem Molekül abgesättigt, und zwar wird der Wasserstoff in der Seitenkette aufgenommen, denn das entstandene Dihydroderivat liefert bei der Ozonisierung nicht mehr den flüchtigen Aldehyd. Dagegen konnte aus dem neutralen Anteil der Ozonisierungsprodukte, die durch reduktive Aufspaltung des Ozonids mit Zink und Eisessig erhalten wurden, ein Keton in Form seines Semicarbazons isoliert werden. Nach den Analysen des schön kristallisierten Semicarbazons und eines Oxims hat dieses Keton die Zusammensetzung $C_{19}H_{34}O$. Ihm würde also ein Kohlenwasserstoff $C_{19}H_{36}$ entsprechen, der gegenüber einem Paraffin ein Defizit von 4 Wasserstoffatomen besitzt, d. h. die Substanz enthält zwei Kohlenstoffringe. Der Wasserstoffreichtum des Ketons zeigt an, daß in ihm noch die aliphatische Seitenkette C_9H_{19} enthalten sein muß. In den beiden Ringen kann es sich also nur um die Ringe C und D des Ergosterin-skeletts handeln. Der dem Ring C entsprechende Ring des Vitamins kann dann nur durch eine Doppelbindung mit dem übrigen Teil des Moleküls verknüpft sein, aus der durch die oxydative

14) E. Fernholz, A. 499, 198 (1932).
15) Lettré, Z. f. angew. Chem. 47, 736 (1934).
16) Guiteras, A. 494, 116 (1932).
17) Z. f. angew. Ch. 31, 521 (1935), A. 521, 160 (1935).

Spaltung die Ketogruppe hervorgegangen ist. Da das C-Atom 10 quartär ist, kann zu ihm keine Doppelbindung führen, sie kann nur von C-Atom 8 ausgehen. Die Bindung von C_9 nach C_{10}, die den Ring C mit dem Ring B des Ergosterins kondensierte, muß danach durch die photochemische Reaktion aufgespalten worden sein. Der durchgeführte Abbau läßt sich folgendermaßen formulieren:

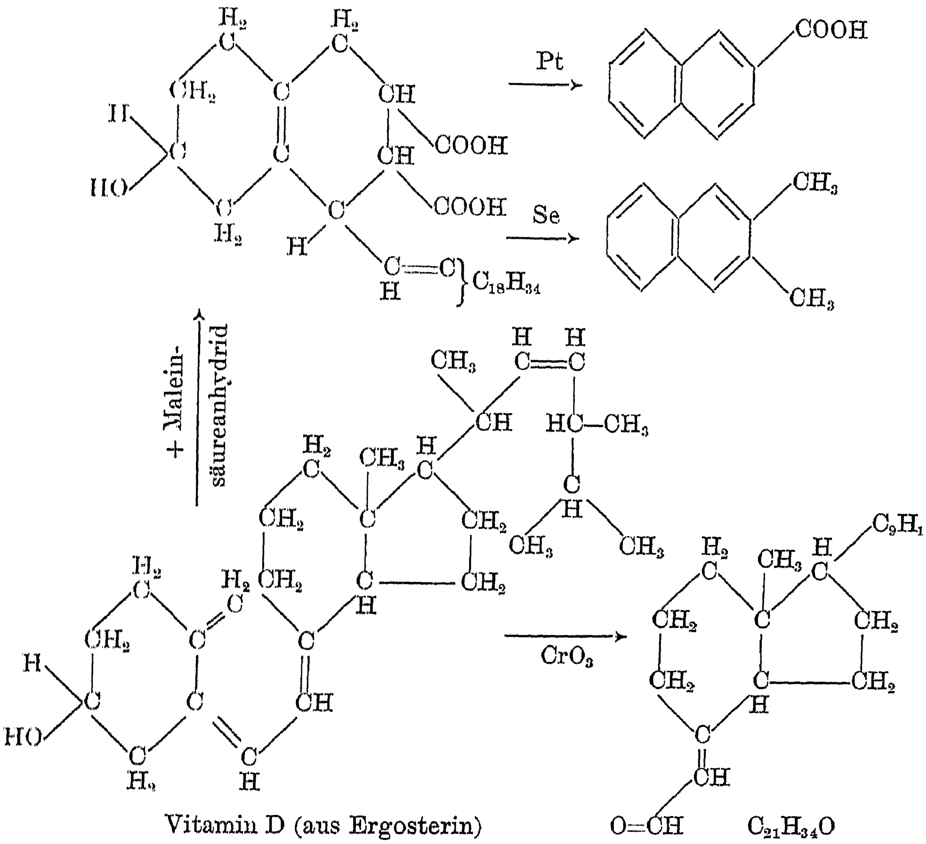


Weiter konnten bei der D e h y d r i e r u n g d e r V i t a m i n - m a l e i n s ä u r e m i t P l a t i n Naphtalin und β-Naphtoesäure erhalten werden. Die Entstehung der β-Naphtoesäure besagt, daß hier der Teil des Moleküls gefaßt wurde, an den sich die Maleinsäure addiert hat, und daß in dem Naphtalin Kohlenstoffatome aus der Maleinsäure eingebaut sind. Der eine Ring des Naphtalins ist der Ring A, der zweite ist aus den restlichen Kohlenstoffatomen und der Maleinsäure entstanden. Die S e l e n - d e h y d r i e r u n g der Vitamin-maleinsäure lieferte unerwarteterweise 2,3-Dimethylnaphtalin, dessen Entstehung durch eine bisher noch nicht beobachtete Reduktion der Carboxylgruppen zu Methylgruppen im Verlauf der Selendehydrierung, die durch Modellversuche belegt wurde, zu deuten ist. Diese Versuche führen zu den folgenden Formelbildern für den zweiten Teil der Vitamin-maleinsäure und damit zu der Konstitutionsformel des Vitamins D.

Gegen diese Formulierung des Vitamins, vor allem gegen die Aufspaltung der C—C-bindung zwischen 9 und 10, die von der Göttinger Schule an verschiedenen Stellen angegeben wurde, obwohl der exakte Nachweis noch ausstand, wird von R o s e n h e i m und K i n g[18]) der Einwand gemacht, daß sie sich mit den Dimensionen der Elementarzelle des Vitamins, die nach den Arbeiten von B e r n a l[19]) sich nur wenig von der des Ergosterins unterscheiden soll, nicht vereinbaren lasse. Der oben

[18]) J. Soc. Chem. Ind. 54, 701 (1935).

[19]) J. Soc. Chem. Ind. 54, 699.



Vitamin D (aus Ergosterin) $C_{21}H_{34}O$

angegebenen Formulierung des Vitamins würde eine gestrecktere Form des Moleküls entsprechen, die die c-Achse der Elementarzelle um etwa 2,6 Å verlängern müßte. Die Forscher schlagen eine Vitaminformel vor, in der die C—C-Bindung zwischen 5 und 10 des Ergosterinskeletts aufgesprengt ist, so daß ein Gebilde mit einem Zehnring entsteht, das den Röntgenmessungen gerecht würde.

Die vorstehend angegebenen Experimente lassen sich jedoch mit dieser Zehnringformel in keiner Weise vereinbaren. Eine wertvolle Stütze hat die Windaussche Formel durch eine Untersuchung von Heilbron[20]) erfahren. Es gelang aus dem Vitamin durch Chromsäureoxydation einen Aldehyd $C_{21}H_{34}O$ in Form seines Semicarbazons zu gewinnen. Eine Nacharbeitung im Göttinger Laboratorium ergab weiter, daß dieser Aldehyd nach seiner Ultraviolettabsorption (Semicarbazon Maximum bei 273 mμ) α,β-ungesättigt ist. Wie aus der obigen Formel des Vita-

[20]) Heilbron, Samant u. Spring, Nature 135, 1072 (1935).
[21]) Ahrens, Fernholz u. Stoll, A. 500, 109 (1933).

mins leicht zu ersehen ist, läßt sich dieser Aldehyd durch Aufspaltung zwischen den C-Atomen 5 und 6 aus dem Vitaminmolekül herausschneiden.

Dihydrovitamin I: Allophanester: Aus Benzol oder Essigester Nadeln vom Schmp. 184—86°. Daraus durch Verseifung der freie Alkohol: aus Aceton Blättchen vom Schmp. 65°, $[\alpha]_D = +11{,}9°$. Dinitrobenzoat des Dihydrovitamin II: aus Aceton-Methylalkohol gelbliche Nadeln vom Schmp. 164—65°. Der freie Alkohol kristallisiert nicht, er ist antirachitisch unwirksam, aber in Dosen von etwa 0,1 mg toxisch.

Perhydrovitamin D[21]) = Oktahydro-vitamin D. $C_{28}H_{52}O$. Schmp. 96—97°. $[\alpha]_D = -7{,}4°$.

E VI d. Die Suprasterine

Die beiden Suprasterine haben nach Analyse und Molekulargewichtsbestimmungen die Zusammensetzung $C_{28}H_{44}O$. Sie enthalten eine veresterbare Hydroxylgruppe[22]) und eine Doppelbindung in der Seitenkette zwischen C-22 und C-23, da als Ozonabbauprodukt der Methyl-isopropyl-acetaldehyd gebildet wird[23]). Die Zahl der Doppelbindungen konnte beim Suprasterin I durch Benzopersäuretitration[22]), Bestimmung der Wasserstoffaufnahme bei der katalytischen Hydrierung[25]) und durch Messung der Molrefraktion[24]) sicher zu drei bestimmt werden. Beim Suprasterin II sind noch einige Differenzen zwischen 3 oder 4 Doppelbindungen zu klären. Benzopersäuretitration, Molrefraktion und Analyse des Perhydro-derivats sprechen für 3 Doppelbindungen. Bei der katalytischen Hydrierung wird der Wert von drei Mol Wasserstoff aber überschritten[25]).

Für das Suprasterin I ist damit erwiesen, daß die photochemische Reaktion die erste Spaltung einer C—C-Bindung wieder rückgängig macht, daß ein erneuter Ringschluß stattgefunden hat, denn bei drei Doppelbindungen können im Suprasterin I nur vier Ringe vorhanden sein. Für einen solchen photochemisch bedingten Ringschluß gibt es Analogien: das Diphenylfulgid lagert sich in ein Dihydro-naphtalinderivat um[26]) oder das doppelt ungesättigte Carvon geht durch innermolekulare Ringschlüsse in ein gesättigtes Keton über[27]). Dieser Ringschluß findet aber nicht an der Stelle statt, die zunächst photochemisch aufgespalten wurde; bei der Selendehydrierung des Suprasterins I konnten keine defi-

22) Windaus, Gaede, Köser u. Stein, A. 483, 17 (1930).
23) Guiteras, A. 494, 116 (1932).
24) v. Auwers u. Wolter, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math. Phys. Klasse 1931, 111.
25) M. Müller, H. 233, 223 (1935).
26) Houben, Meth. d. org. Chemie III. Aufl. 1315.
27) Sernagiotto, C. 1918, II, 1027.

nierten kristallisierten Produkte gefaßt werden, die Bildung des charakteristischen γ-Methyl-cyclo-pentenophenanthrens kann als ausgeschlossen gelten[25]). Für das Suprasterin I ist von M. Müller[25]) eine provisorische Formel aufgestellt worden, doch wird man vorläufig auf eine Formulierung des Suprasterins I verzichten müssen, bis sicher entschieden ist, ob das Vitamin D oder das Toxisterin seine Muttersubstanz ist. Für das Suprasterin II bleibt die Frage des Ringschlusses noch offen; falls es tatsächlich vier Doppelbindungen hat, würde es das Ringskelett des Vitamins enthalten, in dem sich vier isolierte Doppelbindungen befinden.

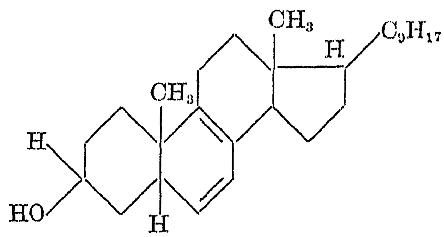
Perhydroprodukte [A. 500, 109 (1933)].
Suprastanol I A: $C_{28}H_{50}O$, Schmp. 116°, $[\alpha]_D = +12°$.
Suprastanol I B: $C_{28}H_{50}O$, Schmp. 146—47°, $[\alpha]_D = +18°$.
Suprastanol II: $C_{28}H_{50}O$ (?) Schmp. 130—31°, $[\alpha]_D = -18{,}4°$.

E VI e. Die thermischen Umwandlungsprodukte des Vitamin D

Das Vitamin D ist bei höheren Temperaturen bis zu 140° unter Luftabschluß beständig. Bei 180° lagert es sich dagegen in zwei physiologisch unwirksame Isomere, das Pyro-calciferol und das Iso-pyro-vitamin, um[28]). Die beiden Stoffe bilden eine Molekülverbindung im Verhältnis 1:1 miteinander, die aus dem Reaktionsgemisch isoliert wird[29]). Durch Acetylierung lassen sich die beiden Stoffe voneinander trennen; das Iso-pyro-vitamin bildet ein schwer lösliches Acetat, während das des zweiten Stoffs sich ölig abscheidet. Die beiden Stoffe von der Zusammensetzung $C_{28}H_{44}O$ enthalten drei Doppelbindungen, die durch Benzopersäuretitration und Analyse der Perhydroderivate sichergestellt sind[29]). Bei der Erhitzung muß daher wiederum ein Ringschluß eingetreten sein, und zwar liegt den Stoffen das Vierringskelett des Ergosterins wieder zugrunde, denn bei der Selendehydrierung wurde aus ihnen das γ-Methylcyclopenteno-phenanthren in guter Ausbeute erhalten[30]). Der Ringschluß ist also an der Stelle erfolgt, die zunächst durch die photochemische Reaktion aufgespalten wurde. Zwei der Doppelbindungen sind konjugiert und liegen in einem Ring: Beide Stoffe addieren Maleinsäureanhydrid und beide liefern bei der Oxydation mit Salpetersäure die Methyl-benzol-tetracarbonsäure[30]). Der Versuch, die Lage der dritten Doppelbindung durch den Ozonabbau festzulegen, steht noch aus. Die experimentellen Befunde lassen sich in der von M. Müller[30]) vorgeschlagenen Formel ausdrücken, der Unterschied zwischen den beiden

[28]) Proc. Roy. Soc. 109, 488 (1932). A. 492, 239 (1932).
[29]) Busse, H. 214, 211 (1933).
[30]) M. Müller, H. 233, 223 (1935).

Isomeren könnte in der verschiedenen räumlichen Anordnung der Substituenten an den C-Atomen 5 und 10 bestehen.



Erhitzungsprodukte des Vitamin D

M o l e k ü l v e r b i n d u n g I s o - p y r o v i t a m i n - P y r o c a l c i f e r o l: Darst. durch Erhitzen des Vitamin D auf 188°. Durch Umkristallisieren des Reaktionsprodukts aus Aceton Nadeldrusen vom Schmp. 122—24°. Daraus durch Acetylierung das Isopyrovitamin-acetat vom Schmp. 113—15°. Isopyrovitamin bildet mit Digitonin eine Anlagerungsverbindung, die jedoch leicht zerlegbar ist. Durch Hydrierung mit Natrium und Alkohol entsteht ein Dihydro-derivat, das durch weitere katalytische Hydrierung das Hexa-hydro-isopyrovitamin liefert: Schmp. unscharf zwischen 68 und 80°. Dinitrobenzoat derbe, gelbliche Prismen vom scharfen Schmp. 164—65°.

P y r o c a l c i f e r o l: aus den verseiften Mutterlaugen des Iso-pyrovitamins als Dinitrobenzoat isoliert. Schmp. des Dinitrobenzoats: 170—71°. Daraus Pyrocalciferol: Nadeln vom Schmp. 94—95°, $[\alpha]_D = +512°$. Durch Hydrierung mit Natrium und Alkohol entsteht ein Dihydroderivat, das durch katalytische Hydrierung in Hexahydro-pyrocalciferol übergeht. Aus Aceton lange Nadeln vom Schmp. 130—31°, $[\alpha]_D = +34{,}45°$. Durch Erhitzen mit Natriumaethylat geht es zu 65% in ein opimeres Derivat über (Schmp. 137°), das zum Unterschied vom Ausgangsmaterial mit Digitonin eine schwerlösliche Verbindung bildet. Die beiden thermischen Umwandlungsprodukte sind antirachitisch unwirksam und besitzen auch keine Giftwirkung.

E VII. Über die Beziehungen zwischen Konstitution und physiologischer Wirksamkeit der Bestrahlungsprodukte

Von den verschiedenen Bestrahlungsprodukten des Ergosterins, deren Konstitution durch die vorher angegebenen Arbeiten weitgehend geklärt ist, ist nur ein Stoff antirachitisch wirksam. Die übrigen Substanzen sind entweder gar nicht physiologisch wirksam oder zeigen nur die gleiche Giftwirkung, die auch dem Vitamin D in höheren Dosen zukommt. Hierzu gehören das Tachysterin, das Toxisterin, das Dihydrotachysterin und Dihydro-vitamin II.

Schon ehe man das kristallisierte Vitamin in den Händen hatte, sind Untersuchungen über die Abhängigkeit der Aktivierbarkeit des Ergo-

sterins von Änderungen des Moleküls gemacht worden. So wurden z. B. die verschiedensten Ester des Ergosterins bestrahlt[1]) und man fand, daß nur das Acetat, das Palmitat und der Phosphorsäureester[2]) durch Bestrahlung in ein direkt wirksames Produkt überging. Andere Ester mit körperfremden Säuren, z. B. das Allophanat, erwiesen sich nach der Bestrahlung als unwirksam. Doch muß auch in diesem Fall die photochemische Reaktion in der gleichen Weise verlaufen sein: nach der Entfernung des Säurerestes durch Verseifung entfalten auch diese Produkte ihre antirachitische Wirkung. Windaus und Rygh zogen daraus den Schluß, daß nur das Bestrahlungsprodukt mit freier Hydroxylgruppe wirksam ist und daß bei Anwendung von Estern mit körpereigenen Säuren der Organismus in der Lage ist, die Ester des durch die Bestrahlung entstandenen Vitamins zu zerlegen. Ergosterin-äther[3]) und das Ergosteringlucosid[4]) zeigen nach der Bestrahlung keine antirachitische Wirksamkeit.

Das oben beschriebene 22-Dihydro-ergosterin, in dem also nur die Doppelbindung in der Seitenkette des Ergosterins abgesättigt ist, läßt sich durch Bestrahlung in ein antirachitisch wirksames Produkt verwandeln. Die Wirksamkeit beträgt nur den 30.—40. Teil von der des reinen Vitamins, doch wurde zur Wertbestimmung nur das rohe Gemisch der Bestrahlungsprodukte verwendet, sodaß die Wirksamkeit des reinen 22-Dihydro-vitamins sicher noch eine bessere sein dürfte. Die Hydrierung der Doppelbindung in der Seitenkette ändert also qualitativ an der Wirksamkeit nichts, doch bedingt sie ein Absinken des Absolutbetrages der wirksamen Dosis. Jeder Eingriff an dem charakteristischen System der zwei konjugierten Doppelbindungen des Ergosterins hebt aber die photochemische Aktivierbarkeit auf. Von den zahlreichen Isomeren des Ergosterins ist keines photochemisch aktivierbar. Nach der Kenntnis der Konstitution des Vitamins erscheint dies auch einleuchtend, denn grade an dieser Gruppierung greift ja die Lichtreaktion an.

Eine große Rolle für die physiologische Wirksamkeit spielt das Dreiring-Skelett, das durch die Aufspaltung einer C-C-Bindung im Ergosterin oder Lumisterin entsteht. Ergosterin und Lumisterin sind beide noch physiologisch unwirksam. Die Ringaufspaltung zum Tachysterin und Vitamin D hin läßt die antirachitische und die Giftwirkung entste-

[1]) Windaus u. Rygh, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math. Phys. Klasse 1928, 202.

[2]) v. Euler c. s., B. 62, 2451 (1929).

[3]) Heilbron c. s., Soc. 1932, 268.

[4]) Unveröffentlicht.

hen. Wird nun die Ringaufspaltung wieder rückgängig gemacht, sei es photochemisch zu den Suprasterinen oder thermisch zu den Pyroderivaten, so geht damit auch wieder die physiologische Wirksamkeit verloren.

Auch die Art der Anordnung der vorhandenen Doppelbindungen ist eng mit der physiologischen Wirksamkeit verknüpft. Das Vitamin D enthält drei Doppelbindungen in fortlaufender Konjugation, doch ist die antirachitische Wirkung nur mit der speziellen Lage der Doppelbindungen verbunden, wie sie in der oben angegebenen Formel des Vitamins dargestellt ist. Das Tachysterin, das ebenfalls drei Doppelbindungen in Konjugation enthält, ist nicht antirachitisch wirksam, sondern zeigt nur in höheren Dosen die gleiche Giftwirkung wie das Vitamin D. Diese Wirkung scheint also wesentlich unspezifischer zu sein: zu ihrer Entfaltung genügen auch schon zwei konjugierte Doppelbindungen, wie das Beispiel des Dihydrotachysterins und des Dihydro-vitamins II zeigt. Das Dihydro-vitamin I mit seinen drei isolierten Doppelbindungen und dem Dreiringskelett ist hingegen physiologisch unwirksam. Das 22-Dihydrotachysterin ist noch giftig, die Hydrierung der Doppelbindung der Seitenkette beeinflußt diese Wirkung also auch nicht.

Die antirachitische Wirkung ist also an das Vorhandensein der freien Hydroxylgruppe in dem Dreiringskelett, das drei konjugierte Doppelbindungen in bestimmter Lage enthält, geknüpft. Die Hydrierung in der Seitenkette beeinflußt die Wirkung nicht. Die Giftwirkung zeigen die Stoffe, die zwei oder drei konjugierte Doppelbindungen in dem Dreiring-

	Ringe	Doppelb.	konj.	isol.	antir.	tox.
Ergosterin	4	3	2	1	—	—
Lumisterin	4	3	2	1	—	—
Tachysterin	3	4	3	1	—	+
Dihydro-tachyst.	3	3	2	1	—	+
22-Dihydro-tachy.	3	3	3	—	—	+
Vitamin D	3	4	3	1	+	+
22-Dihydro-vit.	3	3	3	—	+	?
Dihydro-vit I	3	3	—	3	—	—
Dihydro-vit II	3	3	2	1	—	+
Toxisterin	3(?)	4(?)	2(?)	2(?)	—	+
Suprasterin I	4	3	—	—	—	—
Suprasterin II	4(3)	3(4)	—	3(4)	—	—
Pyro-calciferol	4	3	2	1	—	—
Iso-pyrovitamin	4	3	2	1	—	—

skelett enthalten. Vielleicht kann man für das Toxisterin, das bis jetzt noch nicht rein dargestellt ist und daher noch nicht näher untersucht wurde, aus seiner Giftwirkung die Arbeitshypothese ableiten, daß es wie das Tachysterin und das Vitamin das Dreiring-skelett enthält.

Über den Wirkungsmechanismus des Vitamins D sind eine Reihe von Annahmen erörtert worden, doch hat sich noch kein abgerundetes Bild ergeben. Dhar[5]) nimmt an, daß bei der Anregung der Oxydation im Organismus, die durch das Vitamin hervorgerufen wird[6]), das p_H des Blutes nach der alkalischen Seite verschoben wird und dadurch eine Förderung des Kalkansatzes erzielt wird. Drummond[7]) führt die Wirkung auf eine Erhöhung der Zellpermeabilität zurück. Naheliegend ist die Annahme, daß es direkt in den Calcium-Phosphat-Stoffwechsel eingreift, doch läßt sich bei allen Beobachtungen, die hierfür sprechen, nicht entscheiden, ob sie einen primären oder einen sekundären Effekt, der als Folgeerscheinung der Vitamin-wirkung ausgelöst worden ist, darstellen. Mc. Gowan[8]) nimmt an, daß das Vitamin aus den Phosphatiden anorganisches Phosphat frei und für die Ossifikation verfügbar macht. Das Vitamin steigert den Phosphatase-gehalt von Ratten[9]) und während der Heilung der Rachitis ist ein erhöhter Gehalt des Blutes an Phosphorsäureestern[10]), die der Spaltung durch die Phosphatase zugänglich sind, festzustellen. In vitro hat das Vitamin jedoch keine Phosphatase-wirkung, noch wirkt es als Aktivator auf die Phosphatase.

E VIII. Natürliches Vitamin D und das Vitamin aus Ergosterin

Nachdem so die künstliche Darstellung eines hochwirksamen Stoffes mit antirachitischen Eigenschaften gelungen ist, bliebe es nur noch als Abschluß der Untersuchungen am Vitamin D notwendig, durch direkten Vergleich die vermutete Identität des natürlichen und des Vitamins aus Ergosterin zu beweisen. Wie oben schon erwähnt wurde, sind diese Versuche zur Reindarstellung des natürlichen Vitamins noch nicht von Erfolg gewesen. Doch sprechen die Zusammensetzung, die analogen Stabilitätsverhältnisse, Löslichkeitseigenschaften und auch das Verhalten

---

5) J. physical Ch. 36, 1846 (1932).

6) Seel, Naunyn-Schmiedeb. Arch. 140, 194 (1929). Landelius u. Ljungkoist, Skand. Anh. Physiol. 68, 251 (1934).

7) J. Roy. Soc. Arts. 80, 974 (1932).

8) Mc. Gowan c. s., Biochem. J. 25, 1295 (1931), 27, 943 (1933).

9) Kinard u. Chanutin, J. biol. Chem. 103, 461 (1933).

10) Kay u. Guyath, Nature 131, 468 (1933).

gegen chemische Agenzien zum mindesten für eine weitgehende Ähnlichkeit der beiden Stoffe. Auch die toxische Wirkung, die das Vitamin aus Ergosterin in höheren Dosen zeigt, hat sich bei den angereicherten Präparaten von natürlichem Vitamin D feststellen lassen, und zwar ist auch bei dem natürlichen Vitamin das gleiche Verhältnis von antirachitischer zu toxischer Wirkung vorhanden[1]).

Es findet sich jedoch eine Reihe von Angaben, in denen auf Unterschiede zwischen den beiden Stoffen hingewiesen wird. Ob die von Ender[2]) gefundenen Differenzen in Veresterungsgeschwindigkeit und Absorptionsspektrum reell oder durch Begleitstoffe verursacht sind, ist unentschieden. Das Gleiche gilt von dem Befund von Rygh[3]), daß der antirachitisch wirksame Faktor der Butter, des Heus und der Kuhleber sich nach der Verseifung in der Fettsäurefraktion und nicht im Unverseifbaren findet; es kann sich um ein Vitamin mit Säure-eigenschaften handeln, aber auch nur um eine Emulgierung des neutralen Vitamins in den entstandenen Seifen, die ja eine gewisse Lösefähigkeit haben. Nach Kon und Booth[4]) soll ein Teil des antirachitisch wirksamen Stoffes in der Butter gegen Alkali empfindlich sein.

Wichtiger sind aber die Unterschiede in der physiologischen Wirksamkeit der beiden Stoffe bei verschiedenen Versuchstieren. Durch eine große Zahl von Versuchen ist nachgewiesen, daß Präparate aus natürlichem Vitamin D, die in ihrer Wirkung an der Ratte mit einem Präparat von Vitamin aus Ergosterin gleichgestellt sind, diesem im Versuch am rachitischen Küken um ein Vielfaches überlegen sind[5]). Weiter zeigte sich, daß analoge Unterschiede zwischen einem bestrahlten Roh-Cholesterin (das das natürliche Provitamin enthält) und einem Cholesterinpräparat, dem die nach der Ultraviolett-absorption äquivalente Menge Ergosterin zugesetzt war, bestehen[6]). Dols[7]) kommt in einer kritischen Untersuchung zu dem Schluß, daß Ergosterin nicht mit dem

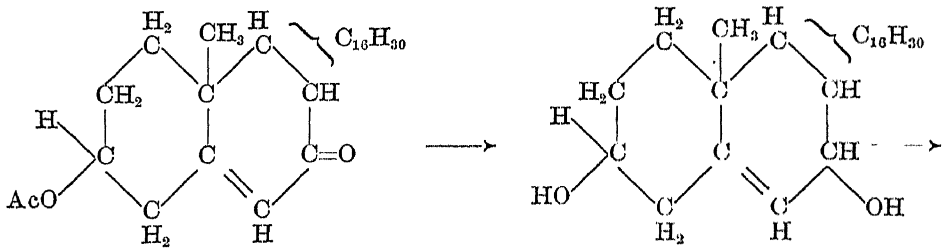
[1]) Dalmer, v. Werder u. Moll, H. 224, 86 (1934).
[2]) Z. f. Vit.forschung 2, 241 (1933), 3, 761 (1934).
[3]) Z. f. Vit.forschung 3, 165 (1934).
[4]) Biochem. J. 27, 1302 (1933), 28, 111, 121 (1934).
[5]) Mussehl u. Ackerson, Poultry Science 9, 334 (1930). Massengale u. Nußmeyer, J. Biol. Ch. 87, 415, 423 (1930). Hess and Supplee, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 27, 609 (1930). Steenbock c. s., J. Biol. Ch. 97 249 (1932). King c. s., Poultry Science 12, 129 (1933). Bethke c. s., J. Nutrition, 6, 413 (1933). Bills c. s., J. Biol. Chem. 108, 323 (1935) (s. 7).
[6]) Waddell, J. Biol. Chem. 105, 711 (1934).
[7]) Dols, Proefschrift Wageningen 1935.

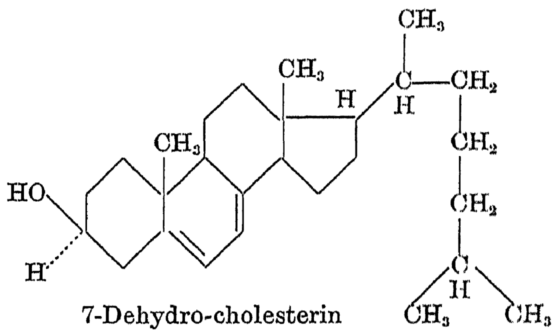
natürlichen Provitamin und daß das Vitamin aus Ergosterin nicht mit dem natürlichen Vitamin D identisch sein kann. Diese Versuche machen also die Isolierung des Vitamins aus Lebertran und auch die des „Provitamins" aus Cholesterin notwendig, um einen direkten Vergleich und eine Entscheidung dieser Frage durchführen zu können. Einen erfolgversprechenden Weg zur Isolierung des Provitamins aus Cholesterin haben Winterstein und Stein[8]) angegeben, die mit Hilfe der Adsorptionsanalyse nach Tswett eine Anreicherung des Provitamins erzielen konnten.

Dagegen ist es schon gelungen, durch synthetische Versuche einen Weg zu erschließen[9]), der vielleicht die aufgetretenen Fragen zu klären vermag, wenngleich er die Isolierung des natürlichen Vitamins nicht überflüssig macht, ja sogar diese Arbeit noch dringlicher erscheinen läßt. Den wesentlichen Unterschied zwischen dem Ergosterin und den anderen eingehend untersuchten Sterinen stellt das charakteristische System der zwei konjugierten Doppelbindungen im Ring B dar. Es ist nun gelungen, in das Molekül des Cholesterins und auch pflanzlicher Sterine eine zweite Doppelbindung so einzuführen, daß dieses System zweier Doppelbindungen wie im Ergosterin entsteht. Die Durchführung dieser Umwandlung sei am Beispiel des Cholesterins geschildert: Das schon oben beschriebene 7-Keto-cholestenol-acetat, das durch Chromsäureoxydation des Cholesterylacetats entsteht, wird mit Aluminium-isopropylat reduziert. Es geht unter Verseifung des Acetatrestes in ein 3,7-Dioxy-cholesten-5 über, dessen Dibenzoat bei der thermischen Zersetzung ein Molekül Benzoesäure abspaltet. Es bildet sich das Monobenzoat eines Cholestadienols. Das Verseifungsprodukt ist mit Digitonin fällbar, es enthält also die Hydroxylgruppe am C-Atom drei. Die neue Doppelbindung ist in Konjugation zu der ersten zwischen C-Atom 7 und 8 entstanden. Das Produkt wird daher als das 7-Dehydro-cholesterin bezeichnet. Es enthält die beiden Doppelbindungen in der gleichen Anordnung wie das Ergosterin und tatsächlich stimmt sein Ultraviolettabsorptionsspektrum qualitativ und quantitativ mit dem des Ergosterins überein. Dasselbe gilt für die aus den Pflanzensterinen auf analogem Wege dargestellten Dehydrosterine. Das bemerkenswerteste aber ist es, daß das Dehydro-cholesterin sich durch die Einwirkung des ultravioletten Lichts ebenso wie das Ergosterin in ein antirachitisch wirksames Produkt verwandeln läßt.

[8]) H. 220, 247 (1933).

[9]) Windaus u. Mitarbeiter, A. 520, 98 (1935), unveröffentlichte Versuche.





7-Dehydro-cholesterin

Über den Absolutbetrag der Wirkung läßt sich noch keine genaue Angabe machen, das rohe Bestrahlungsprodukt ist im Schutzversuch bei der Ratte zu 0,15 γ voll wirksam. Auch die Frage, ob dieses neue Provitamin in seiner physiologischen Wirksamkeit an Ratte und Huhn dem natürlichen Vitamin entspricht, ist z. Zt. noch nicht entschieden. Interessant ist es aber, daß die Wirksamkeit des aus dem Stigmasterin hergestellten Dehydroderivats nach der Bestrahlung außerordentlich gering, vielleicht überhaupt nicht vorhanden ist. Es zeigt sich also, daß die Variationsbreite, innerhalb der man „Provitamine“ herstellen kann, die sich vom Ergosterin nur durch den Aufbau der Seitenkette unterscheiden, relativ gering ist. Die exakte Festlegung der Abstufungen der Wirksamkeit bei den einzelnen Provitaminen steht noch aus.

Obschon damit erst ein neues Gebiet der Untersuchungen an dem antirachitischen Vitamin und seinen Vorstufen erschlossen ist, dessen Bearbeitung noch in den ersten Anfängen steht, läßt sich doch eine sehr wahrscheinliche Hypothese über den Aufbau der Provitamine in den verschiedenen pflanzlichen und tierischen Sterinen machen. Die Annahme, daß in all diesen Stoffen das Ergosterin als Provitamin in kleinen Mengen vorhanden sei und daß das Ergosterin in allen Sterinen, tierischen und pflanzlichen Ursprungs, vorkomme, stützt sich nur auf den Vergleich des Ultraviolett-spektrums des Provitamins mit dem des Ergosterins. Da diese synthetischen Dehydro-sterine aber das gleiche Spektrum wie das

Ergosterin besitzen, erscheint diese Annahme nicht mehr eindeutig. Im Prinzip könnte ein jeder der neuen Dehydrostoffe als Provitamin in Frage kommen. Sehr viel wahrscheinlicher erscheint es aber daher, daß einem jeden natürlichen Sterin das Provitamin beigemengt ist, das in seiner Konstitution seiner Muttersubstanz entspricht. Es würde somit nicht nur ein Provitamin D, das Ergosterin, geben (wenn wir von Lumisterin und Tachysterin absehen), sondern neben ihm andere Provitamine, die in ihrem Aufbau den tierischen oder Pflanzensterinen entsprechen, und von jedem dieser Provitamine leitet sich wieder ein verschiedenes Vitamin ab. Das Ergosterin ist demnach nicht das Provitamin D und der antirachitisch wirksame Stoff aus dem Ergosterin ist nicht das einzige Vitamin D, sondern diese Stoffe erscheinen nur als Typen einer Reihe von verschiedenen, aber doch sehr ähnlichen Provitaminen und Vitaminen.

Der Heilung der Rachitis ist durch die Umwandlung des Ergosterins in ein Vitamin D ein optimal wirksames Produkt an die Hand gegeben, das seine Bedeutung durch die leichte Zugänglichkeit des Ergosterins nicht verlieren wird. Zur endgültigen Abrundung unserer Kenntnisse vom natürlichen Vitamin und den möglichen Abarten bleibt eine Weiterarbeit in verschiedenen Richtungen notwendig: die Isolierung des Provitamins aus dem Cholesterin muß angestrebt werden, um einen Vergleich mit Ergosterin oder dem Dehydro-cholesterin zu ermöglichen, und weiter ist die Isolierung des natürlichen Vitamins aus dem Lebertran notwendig, um den Vergleich mit den wirksamen Produkten aus Ergosterin, Dehydrocholesterin oder anderen Dehydrosterinen durchführen zu können.

Man sieht, wie die Untersuchungen auf dem Vitamin D-Gebiet einen gewissen Abschluß erreicht hatten. Es war gelungen, hochwirksame, kristallisierte Präparate darzustellen und auch ihren Aufbau weitgehend zu klären, und doch hat sich jetzt wieder der Forschung ein neuer Fragenkomplex gestellt, mit dessen Lösung noch große Schwierigkeiten verknüpft sein werden und dessen endgültige Abklärung der Zukunft überlassen bleiben muß.

Mit den Gallensäuren, Keimdrüsenhormonen, pflanzlichen Herzgiften, neutralen Saponinen und dem antirachitischen Vitamin ist die Zahl der Stoffe erschöpft, die sich bis jetzt zu den Sterinen in Beziehung haben setzen lassen. Die Verwandtschaft mit den Krötengiften, die durch die neueren Untersuchungen außerordentlich wahrscheinlich gemacht worden ist, bedarf noch einer exakteren Festlegung. Erwähnt sei noch, daß die Möglichkeit erwogen wird, daß das Vitamin E, das Anti-

sterilitätsvitamin, vielleicht auch in die Gruppe der Sterin-abkömmlinge einzureihen ist.

In den beiden Übersichtstafeln sind die Zusammenhänge, die sich zwischen den einzelnen Stoffklassen ergeben haben, noch einmal zusammenfassend dargestellt. Die Pfeile deuten Übergänge an, wie sie teilweise in vitro durchgeführt worden sind, wie sie auch als Übergänge innerhalb des Organismus wahrscheinlich erscheinen oder nur formell nach den Analogien im chemischen Aufbau gedeutet werden können. Es bleibt eine wesentliche Aufgabe festzustellen, ob tatsächlich die Sterine als Muttersubstanzen aller anderen Stoffe dieser Klasse zu gelten haben, eine Möglichkeit, die sich durch die nahe chemische Verwandtschaft ja unmittelbar aufdrängt, oder ob eine selbständige Bildung dieser Stoffe neben den Sterinen stattfindet, wobei etwa einem Stoff wie dem Dimethyl-hexadehydrozibeton (s. S. 103) eine zentrale Bedeutung zukäme. Die Untersuchungen auf diesem Gebiet, die vor allem mit den Namen W i e l a n d, W i n d a u s und ihrer Schüler verknüpft sind, haben jedenfalls das interessante Ergebnis gebracht: im Cyclo-pentano-perhydro-phenanthren hat sich ein neuer biologischer Grundtypus finden lassen, der durch seine mannigfachen Beziehungen zu wichtigen Naturstoffen eine selbständige Stellung neben den anderen Haupttypen, wie Fetten, Kohlenhydraten, Eiweiß, Carotinoiden usw. verdient.

Nachtrag bei der Korrektur

Zu S. 96. Über das verschiedene Verhalten von Cholestanon und Koprostanon bei der Substitution mit Brom siehe Butenandt, B. 68, 2091 (1935).

Zu S. 116. Bengttson [H. 237, 46 (1935)] hält die Identität von Stigmastanol und Sitostanol für wahrscheinlich. Die Identität von Fucostanol (S. 117) und Stigmastanol wird in Zweifel gezogen.

Zu S. 145. Siehe auch die Arbeiten von Sobotka c. s., Biochem. J. 26, 555, 898, 905 (1932).

Zu Kapitel D I: Testosteron [Androstenol-(17)-on(3)]

Die schon beim Androsteron und beim α-Follikelhormon gemachte Beobachtung, daß durch Reduktion der Carbonylgruppe an C-17 eine wesentliche Erhöhung der physiologischen Aktivität hervorgerufen werden kann, hat Butenandt und Hanisch[1]) dazu geführt, dieselbe Umwandlung auch mit dem Androstendion (s. S. 245) durchzuführen, dessen Bedeutung als männliches Sexualhormon durch seine ausgeprägte starke Wachstumswirkung auf den Genitaltrakt der Nager in letzter Zeit eindeutig erwiesen werden konnte.

Die Darstellung des Androstenol-17-on-3 gelang auf folgendem Wege: Als Ausgangsmaterial diente das trans-Dehydro-androsteron (s. S. 243), dessen Ketogruppe an C-17 durch Behandeln mit Natrium und Propylalkohol in eine Alkoholgruppe verwandelt wurde. Das so erhaltene $\Delta^{5,6}$-Androstendiol ist im Hahnenkammtest äußerst wenig wirksam, bewirkt aber überraschenderweise an der infantilen normalen Ratte in einer Dosis von 35 γ (2mal täglich über 3 Tage) vorzeitige Öffnung der Vagina mit unmittelbar anschließender Brunst, und ist im Allen-Doisy-Test an der kastrierten weiblichen Maus mit 150 γ (2mal täglich über 2 Tage) voll wirksam.

Aus dem Diacetat dieses Androstendiols läßt sich durch partielle Verseifung (nach der beim Pregnandiol angegebenen Methode S. 270) ein Monoacetat erhalten, das die freie Hydroxylgruppe am C-Atom 3

[1]) B. 68, 1859 (1935), H. 237, 89 (1935).

trägt. Dieses Monoacetat kann nach der üblichen Methode zum Keton dehydriert werden: Schutz der Doppelbindung durch Addition von Brom, dann vorsichtige Oxydation mit kalter Chromsäurelösung, der sich die Entbromung mit Zink und Eisessig anschließt. Man erhält so das Acetylderivat des Androstenol-17-on-3 (Formel s. Tafel II).

Diese Substanz ist gleichzeitig auf dieselbe Weise auch von Ruzicka und Wettstein[2]) bereitet worden. Diese Forscher gingen von dem Gedanken aus, daß das Androstendion oder Androstenon-ol in den Testes vorhanden sein könne. Mit dieser Annahme ließen sich folgende im Laufe der letzten Jahre gemachten Beobachtungen in Einklang bringen.

1. Verschiedene Präparate von der Wirkung des männlichen Hormons stimmten in quantitativer Hinsicht beim Hahnenkammtest und beim Vesikulardrüsentest nicht überein[3]) [4]). Die meisten Hormonfraktionen aus Männerharn und reines Androsteron wirken relativ stärker auf den Kapaunenkamm, während Testesextrakte eine ausgeprägtere Wachstumswirkung auf den Genitaltrakt der Nager zeigen.

2. Während die Hormone des Harns sich gegen heißes Alkali beständig erweisen, wurde die Hormonwirkung von Testesextrakten bei dieser Behandlung zerstört[4]). Eine ähnliche Alkaliempfindlichkeit hatte man schon bei rohen Corpus-luteum-Extrakten gefunden, die bekanntlich das Progesteron enthalten, das ebenso wie Androstendion und Androstenol-on eine α,β-ungesättigte Ketogruppe enthält.

Kürzlich ist es nun David, Dingemanse, Freud und Laqueur[5]) gelungen, aus Stier-Testes ein kristallisiertes männliches Sexualhormon, das Testosteron, in reinem Zustand zu isolieren. Das Testosteron hat die Zusammensetzung $C_{19}H_{28}O_2$ und besitzt eine sekundäre Alkoholgruppe sowie eine α,β-ungesättigte Ketogruppe. Beim genauen Vergleich des aus Stierhoden isolierten Testosterons mit dem künstlich dargestellten Androstenol-17-on-3 konnte die vermutete Identität beider Stoffe einwandfrei erwiesen werden.

Von allen Stoffen, die im Hahnenkammtest und im Vesikulardrüsentest wirksam sind, besitzt das Testosteron bis jetzt die größte Bedeutung als männliches Sexualhormon. Bei einmaliger Injektion an

[2]) Helv. Ch. A. 18, 1264 (1935).

[3]) Laqueur und Münch, Ber. ges. Physiol. 61, 3/4 (1931). Matsuzaki, Jap. J. Med. Sci. 7, Nr. 1 (1934). Dingemanse, Freud und Laqueur, Nature 135, 184 (1935).

[4]) Gallagher und Koch, Endocrinology 18, 107 (1934).

[5]) H. 233, 281 (1935). Acta brevia Neerl, 4, Heft 5/6.

2 Tagen (Butenandt-Test) bewirken 25—30 γ Testosteron als Tagesdosis ein durchschnittliches Kammwachstum von 20%, es ist also etwa sechsmal wirksamer als Androsteron. In der Wirksamkeit auf die Vesikulardrüse der infantilen Ratte übertrifft Testosteron bei weitem alle bisher geprüften Stoffe. 100 γ Testosteron einmal täglich über acht Tage verabfolgt (Butenandt-Test) bewirken bis zum neunten Tage die Umwandlung des unentwickelten Epithels der infantilen Vesikulardrüse in das sekretionsfähige Epithel eines normalen geschlechtsreifen Tieres. Nach David, Dingemanse, Freud und Laqueur scheint in den Organextrakten noch ein (für sich allein physiologisch unwirksamer) „Aktivator" des Testosterons vorhanden zu sein, durch dessen Anwesenheit die Aktivität des Testosterons gesteigert werden soll.

Ein viertes, aus Testes isoliertes Kristallisat[6]) scheint mit Androstan-dion identisch zu sein. Androstandion besitzt gleichfalls eine starke Wirksamkeit im Rattentest und kann daher möglicherweise ein weiteres natürliches männliches Hormon darstellen.

Androstendiol: Blättchen aus Aceton-Petroläther, Schmp. 177—178°, $[\alpha]_D = -55{,}5^\circ$ (Propylalkohol). Diacetat: Blättchen aus Methanol, Schmp. 159,5°.

Androstendiol-17-monoacetat: Aus verd. Aceton Nadeln, Schmp. 148°.

Testosteronacetat: Aus verd. Aceton Nadeln, Schmp. 138°.

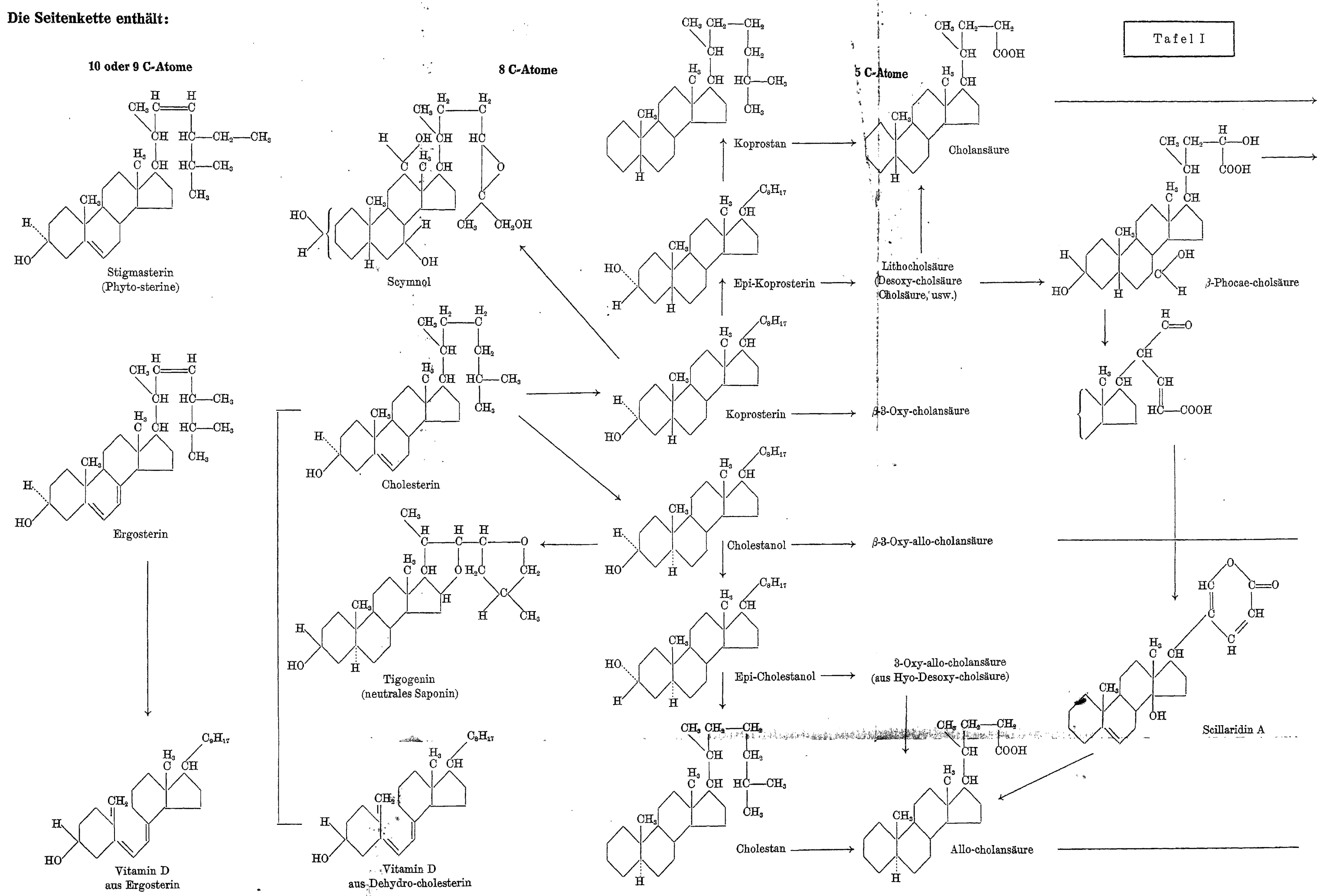
Testosteron: Aus verd. Aceton Nadeln, Schmp. 151°, $[\alpha]_D = +104^\circ$ (Alkohol). Oxim, Schmp. 205°.

---

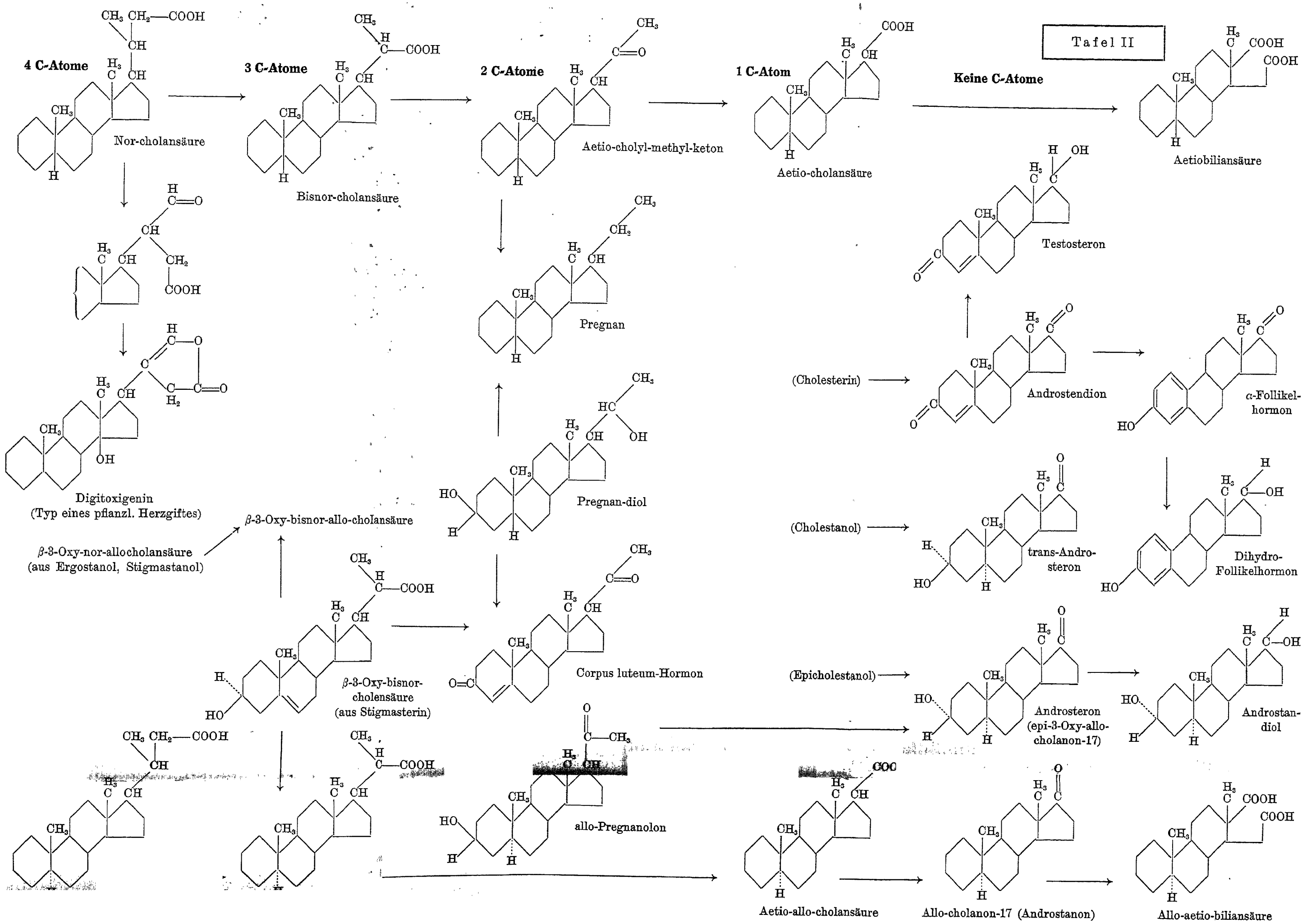
[6]) Ogata und Hirano, J. Pharm. Soc. Japan 54, 199 (1934).

Sachverzeichnis

Tafel I


Die Seitenkette enthält:
10 oder 9 C-Atome
8 C-Atome
5 C-Atome
Stigmasterin
(Phyto-sterine)
Ergosterin
Vitamin D
aus Ergosterin
Scymnol
Cholesterin
Tigogenin
(neutrales Saponin)
Vitamin D
aus Dehydro-cholesterin
Koprostan
Epi-Koprosterin
Koprosterin
Cholestanol
Epi-Cholestanol
Cholestan
Cholansäure
Lithocholsäure
Desoxy-cholsäure
Cholsäure, usw.)
β-3-Oxy-cholansäure
β-3-Oxy-allo-cholansäure
3-Oxy-allo-cholansäure
(aus Hyo-Desoxy-cholsäure)
Allo-cholansäure
β-Phocae-cholsäure
Scillaridin A

Tafel II


4 C-Atome
3 C-Atome
2 C-Atome
1 C-Atom
Keine C-Atome
Nor-cholansäure
Bisnor-cholansäure
Aetio-cholyl-methyl-keton
Aetio-cholansäure
Aetiobiliansäure
Testosteron
Pregnan
(Cholesterin)
Androstendion
α-Follikel-hormon
Digitoxigenin
(Typ eines pflanzl. Herzgiftes)
Pregnan-diol
(Cholestanol)
trans-Andro-steron
Dihydro-Follikelhormon
β-3-Oxy-bisnor-allo-cholansäure
β-3-Oxy-nor-allocholansäure
(aus Ergostanol, Stigmastanol)
β-3-Oxy-bisnor-cholensäure
(aus Stigmasterin)
Corpus luteum-Hormon
(Epicholestanol)
Androsteron
(epi-3-Oxy-allo-cholanon-17)
Androstan-diol
allo-Pregnanolon
Aetio-allo-cholansäure
Allo-cholanon-17 (Androstanon)
Allo-aetio-biliansäure